

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN  
PROF. DR. MICHAEL MELTER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ANALYSE DER IL-15 UND SNAIL EXPRESSION IN FIBROTISCHEN  
UND ZIRRHOTISCHEN HUMANEN LEBERGEGEWEBEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Regine Vogt

2013



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN  
PROF. DR. MICHAEL MELTER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ANALYSE DER IL-15 UND SNAIL EXPRESSION IN FIBROTISCHEN  
UND ZIRRHOTISCHEN HUMANEN LEBERGEGEWEBEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Regine Vogt

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Weiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus Hellerbrand

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2014

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Leberzirrhose .....	1
1.1.1	Definition .....	1
1.1.2	Epidemiologie und Ätiologie .....	2
1.1.3	Klinik .....	3
1.1.4	Diagnostik .....	3
1.1.5	Therapie und Komplikationen .....	4
1.1.5.1	Hepatozelluläres Karzinom (HCC) .....	4
1.1.6	Einteilung der Leberzirrhose nach Child-Turcotte-Pugh und MELD .....	5
1.1.7	Pathogenese der Leberzirrhose .....	6
1.2	EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition).....	9
1.2.1	EMT-assoziierte Prozesse .....	10
1.2.2	EMT und Snail .....	11
1.3	Snail .....	12
1.3.1	Expression und Struktur von Snail.....	12
1.3.2	Regulierung von Snail.....	12
1.3.3	EMT/ Snail in der Leber .....	13
1.4	Inflammation und Leberzirrhose.....	13
1.5	Interleukin-15 .....	14
1.5.1	Struktur und Expression von IL-15 .....	14
1.5.2	Transkriptionale und translationale Regulation von IL-15.....	15
1.5.3	Der IL-15 Rezeptor und seine Verbindung zum IL-2- Rezeptor .....	15
1.5.4	Signaltransduktion von IL-15 .....	16
1.5.5	IL-15 und immunologische Zellen .....	17
1.5.6	IL-15 und nicht-immunologische Zellen .....	18
1.5.7	Potentielle therapeutische Strategien mit IL-15 .....	19
1.5.8	IL-15 und Leberfibrose/ -zirrhose.....	20

1.6	Zielsetzung und Fragestellung .....	22
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Reagenzien, Materialien und Geräte .....	24
2.2	Methoden .....	25
2.2.1	Gewebeproben und Erhebung von Patientendaten.....	25
2.2.2	RNA-Isolation.....	26
2.2.2.1	Prinzip.....	26
2.2.2.2	Durchführung.....	26
2.2.2.3	Quantifizierung der RNA und Analyse der Reinheit .....	28
2.2.3	Analyse der RNA-Qualität mit dem Bioanalyzer 2100 .....	29
2.2.3.1	Prinzip.....	29
2.2.3.2	Durchführung.....	29
2.2.4	cDNA- Synthese und qRT-PCR-Analyse.....	30
2.2.5	Anfertigen der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie .....	30
2.2.6	Immunohistochemische Färbung von IL-15.....	31
2.2.7	Statistische Auswertung .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Eigenschaften der Gewebeproben.....	33
3.2	IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression .....	34
3.2.1	Deskriptive Auswertung der mRNA Expression von IL-15 und Snail .....	34
3.2.2	Fragestellung 1: Zusammenhang zwischen der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA und der Fibroseprogression in humanen Lebergeweben .....	35
3.2.3	Fragestellung 2: Bedeutung der Ätiologie der humanen Leberfibrose/ -zirrhose für die Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA.....	37
3.2.4	Fragestellung 3: Korrelationen zwischen IL-15 und Snail mRNA Expression und patientenbezogenen Daten.....	40
3.2.4.1	Child-Turcotte-Pugh- und MELD-Score.....	40
3.2.4.2	Klinische Parameter .....	42
3.2.4.3	Genussmittelkonsum .....	45
3.2.4.4	Laborchemische Parameter .....	48

3.2.4.5	Histopathologische Veränderungen .....	51
3.2.5	Fragestellung 4: Zusammenhang der Expressionslevel von IL-15 mRNA und Snail mRNA in humanen Lebergeweben mit der Überlebenszeit der Patienten.....	52
3.3	Lokalisation von IL-15 im Lebergewebe.....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
4.1	Korrelation der IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit der Gewebe- diagnose.....	64
4.2	Korrelation der IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit der Ätiologie der Leberzirrhose .....	67
4.3	Korrelation der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit CTP- und MELD-Score .....	68
4.4	Korrelation der IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit histopathologischen Veränderungen, klinischen Merkmalen und laborchemischen Daten .....	70
4.5	Korrelation der Expression von IL-15 und Snail mRNA mit dem Patienten- überleben .....	75
4.6	Nachweis von IL-15 im Lebergewebe .....	76
4.7	IL-15 und Snail als Biomarker und/oder therapeutisches Target? .....	77
4.8	IL-15: Faktor der Leberregeneration oder der Lebergewebeschädigung?.....	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>
<b>11</b>	<b>Posterpräsentationen .....</b>	<b>104</b>



<b>12</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>105</b>
-----------	------------------------	------------

# **1 Einleitung**

Die Leber ist die größte Drüse im menschlichen Organismus und das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels. Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählen der Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen. Die Leber ist damit das Hauptentgiftungsorgan des Körpers. Des Weiteren werden in der Leber lebenswichtige Proteine wie Gerinnungsfaktoren, Bluteiweiße und Abwehrstoffe, sowie Galle produziert. Darüber hinaus spielt die Leber eine wichtige Rolle bei der Verwertung von Nahrungsbestandteilen: Fast alle Nährstoffe, die aus dem Darm ins Blut aufgenommen werden, passieren zunächst die Leber, bevor sie dann je nach Bedarf an das Blut abgegeben oder aus dem Blut entfernt werden. Weitere Aufgaben der Leber beinhalten die Speicherung von Vitaminen und die Synthese von Ausgangsprodukten für die Hormonproduktion (Schmidt, 2010).

## **1.1 Leberzirrhose**

### **1.1.1 Definition**

Die Leberzirrhose ist ein komplexes Krankheitsbild, das durch die Zerstörung der hepatischen Läppchen- und Gefäßstruktur gekennzeichnet ist. In der geschädigten Leber kommt es zunächst zu einer Fibrosierung, der im Wesentlichen eine Vermehrung von Extrazellulärmatrix (EZM) zugrunde liegt. Diese Fibrosierung ist einer Art Wundheilungsprozess gleichzusetzen und grundsätzlich reversibel. Bei einer chronischen Schädigung kommt es jedoch zu einer progressiven Vermehrung der EZM, die schließlich in einem Ersatz des Leberparenchyms durch Narbengewebe endet. Diesen Zustand bezeichnet man als Leberzirrhose. Sie geht mit der Bildung von Regeneratknoten und der Schädigung der Gefäßstruktur in der Leber einher (Hernandez-Gea, 2011). Der daraus resultierende Funktionsverlust führt zu Leberinsuffizienz, portaler Hypertension, Aszites und hepatischer Enzephalopathie (Friedmann, 2008).

### 1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Aktuellen Schätzungen nach sind etwa 0,15% der Bevölkerung in den USA und Europa von einer Leberzirrhose betroffen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Zahl tatsächlich noch viel höher liegt, da viele Leberzirrhosen nicht diagnostiziert werden (Schuppan, 2008). In Deutschland beträgt die Prävalenz der Patienten mit Leberzirrhose vermutlich etwa 0,5-0,8% (Huber, 2001). In Industrieländern sind die meisten Zirrhosen durch Alkoholabusus oder Hepatitis C verursacht, während Hepatitis B in den meisten Ländern Asiens und im subsaharischen Afrika die führende Ätiologie darstellt (Schuppan, 2008). Als weitere bedeutende Ursache für Leberzirrhose in den Industrienationen ist die NASH (Nichtalkoholische Steatohepatitis) anzuführen, die mit Übergewicht und Typ-II-Diabetes assoziiert ist (Straub, 2010). Weitere Einflüsse, die zu einer Leberzirrhose führen, sind in Tab. 1 aufgeführt:

Tabelle 1: Ursachen der Leberzirrhose (neben alkoholtoxischer und viraler Zirrhose). Nach Arasteh, 2009.

Ursache	Beispiel
Fremdstoffe	Toxine (z.B. Aflatoxin) Arzneimittel (z.B. Methotrexat)
Parasitäre Infektionen	Schistosomiasis
Autoimmunerkrankungen	Autoimmune chronische Hepatitis Primär biliäre Zirrhose (PBC)
Gallenwegserkrankungen	Gallengangatresie und -stenose Choledocholithiasis Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)
Stoffwechselerkrankungen	Morbus Wilson Hämochromatose $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel Glykogenose Galaktosämie Tyrosinämie Mukoviszidose
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Budd-Chiari-Syndrom Pericarditis constrictiva Chronische Rechtsherzinsuffizienz

Als kryptogene Leberzirrhosen werden Zirrhosen bezeichnet, deren Ursache nicht feststellbar ist. Sie machen seit der Entdeckung von Hepatitis C und NASH nur noch einen sehr geringen Teil der Leberzirrhosen aus (Schuppan, 2008).

### **1.1.3 Klinik**

Patienten mit beginnender Leberzirrhose sind anfangs oft asymptomatisch. Bei vielen Patienten ändert sich dieser Zustand auch lebenslang nicht, sodass deren Leberzirrhose oft eher zufällig (erhöhte Transaminasen im Serum bei einer Routinekontrolle oder Leberparenchymveränderungen in der Bildgebung) oder sogar erst bei der Autopsie diagnostiziert wird (Conn, 1993; Groszmann, 2005). Zu Beginn treten meist unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme auf. Typische Symptome zeigen sich meist erst bei fortgeschrittener oder bereits dekompensierter Erkrankung. Dazu zählen Ikterus, Spider naevi, Aszites und Splenomegalie. Der gestörte Östrogenabbau führt beim Mann zu Gynäkomastie und zu einem femininen Behaarungsmuster („Bauchglatze“), bei Frauen zu Zyklusstörungen (Schuppan, 2008).

### **1.1.4 Diagnostik**

In der Labordiagnostik gibt es bisher keinen Serumparameter, der eine eindeutige Diagnose der Leberzirrhose ermöglicht (Friedmann, 2004). Die oft verwendete Bezeichnung „Leberfunktionstests“ ist daher unzutreffend, denn keiner der bekannten Laborwerte kann die Funktion der Leber korrekt darstellen (Yee, 2002). Dennoch ist eine Erhebung dieser Laborparameter sinnvoll, da sie im Zusammenhang mit dem klinischen Kontext Hinweise auf eine Erkrankung der Leber geben können (Dufour, 2000). Sie umfassen die Bestimmung von Transaminasen (GOT, GPT), Cholestaseparametern (AP, GGT, Serum-Bilirubin) und die Bestimmung von Serum-Albumin, Cholinesterase (CHE) und Quick-Wert als Marker für die Syntheseleistung der Leber. Zur Ursachenabklärung der Zirrhose sollten eine Hepatitis-Serologie (B, C, ggf. D) und Autoantikörperdiagnostik erfolgen, bei Verdacht auf Stoffwechselerkrankungen empfiehlt sich die Bestimmung von Transferrin (Hämochromatose), Coeruloplasmin (Morbus Wilson) und  $\alpha$ 1-Antitrypsin ( $\alpha$ 1-Antitrypsin-Defizienz) (Schuppan, 2008). Da Laborwerte im Normbereich eine Leberzirrhose nicht ausschließen, sind zur Diagnosesicherung weitere Untersuchungen notwendig (Bahr, 1999). Zur

weiterführenden Diagnostik zählen Sonographie, CT und MRT. Diese sind nicht sensitiv genug, um eine Leberzirrhose eindeutig zu diagnostizieren, eignen sich jedoch als richtungsweisende Untersuchungen (Ito, 1999; Tchelepi, 2002). Goldstandard zur Diagnose der Leberzirrhose ist die Leberbiopsie mit anschließender Histologie. Damit lassen sich das Ausmaß der Fibrosierung sowie die Menge an Entzündungsinfiltraten bestimmen, welche die Beurteilung der Progression der Erkrankung ermöglichen. Teilweise lässt die Histologie auch Rückschlüsse auf die Ursache der Leberzirrhose zu, z.B. sprechen periportal gelegene, eisenüberladene Hepatozyten für eine Hämochromatose (Bravo, 2001).

### **1.1.5 Therapie und Komplikationen**

Die Therapie der Leberzirrhose besteht in erster Linie in der Eliminierung aller potentiell lebertoxischen Substanzen und Medikamente. Die Behandlung der Grundkrankheit richtet sich nach der jeweiligen Ätiologie: Karenz ursächlicher Noxen, immunsuppressive Therapie bei Autoimmunprozessen, Versuch einer Viruselimination mittels Virustatika bei Hepatitis B und C und Eisen- bzw. Kupferentfernung bei Hämochromatose und Morbus Wilson (Orrego, 1987; Francazani, 1995; Dufour, 1997; Lok, 2004; Everson, 2005). Die Behandlung sollte immer die Therapie der Komplikationen der Zirrhose miteinbeziehen (z.B. Aszites, Ösophagusvarizen, spontan-bakterielle Peritonitis). Ultima ratio in der Therapie der Leberzirrhose ist die Lebertransplantation (Schuppan, 2008).

#### **1.1.5.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)**

Eine potentielle Spätkomplikation der Leberzirrhose ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms, ein hochmaligner Tumor der Leber (Schuppan, 2008). Es ist der sechsthäufigste Tumor weltweit mit der dritthöchsten tumorassoziierten Mortalität. Patienten mit Leberzirrhose haben ein jährliches Risiko von 1-6% für die Entwicklung eines HCC (Huber, 2001). 80-90% der HCC entstehen auf dem Boden einer Leberzirrhose. 2008 wurden weltweit insgesamt 750.000 Neuerkrankungen gemeldet (Ferlay, 2010). In Deutschland beträgt die Prävalenz des HCC 3,4 pro 100.000 für Männer und 1,5 pro 100.000 für Frauen. Zu den häufigsten Ursachen des HCC zählen eine chronische Infektion mit Hepatitis B und C, Alkoholabusus und die NASH (El-Serag, 2007). Wegen des hohen Risikos für die Entwicklung eines HCC sollten Patienten mit Leberzirrhose mindestens einmal jährlich einem Screening unterzogen werden, das eine Bildgebung mittels Sonographie, CT oder MRT beinhaltet. Die Bestimmung des AFP im Serum wird aufgrund

mangelnder Sensitivität und Spezifität nicht mehr empfohlen (Bruix, 2001). Die Therapie des HCC besteht in erster Linie in der Leberteilresektion bzw. in der Lebertransplantation. Allerdings kann eine kurative chirurgische Resektion eines HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose nur bei Patienten mit ausreichend guter Synthesefunktion und einem solitären, peripher gelegenen Herd von maximal 3 cm Durchmesser erreicht werden. Jüngere Patienten, die einen solitären Herd bis 5 cm Durchmesser oder drei Herde mit maximal 3 cm Durchmesser aufweisen, sind Kandidaten für eine Lebertransplantation (Milan-Kriterien). Zudem bestehen interventionelle Therapieoptionen wie die perkutane Ethanolinjektion, transarterielle Chemoembolisation, Radiofrequenz-Thermoablation und irreversible Elektroporation (Llovet, 2003; Guo, 2010). Die Prognose des HCC ist schlecht: Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 6-16 Monate (Yao, 2009).

### 1.1.6 Einteilung der Leberzirrhose nach Child-Turcotte-Pugh und MELD

Zur prognostischen Einschätzung der Leberzirrhose werden die Einteilungen nach Child-Turcotte-Pugh (CTP) oder MELD (Model for End-Stage Liver Disease) verwendet. Mithilfe dieser Scores kann die durchschnittliche Überlebenszeit des Patienten errechnet werden, um den Schweregrad der Leberzirrhose einzuschätzen (Cholongitas, 2006). In die Kalkulation des CTP fließen folgende Werte ein: Albumin und Bilirubin im Serum, Quick, Aszites (mittels Sonographie) und Grad der Enzephalopathie. Die Addition der Werte, die in Tab.2 aufgeführt sind, ermöglicht die Einteilung der Leberzirrhose in die Gruppen Child A, B oder C (Bahr, 1999).

Tabelle 2: Klassifikation der Leberzirrhose nach Child-Turcotte-Pugh (nach Bahr, 1999).

	<b>1 Punkt</b>	<b>2 Punkte</b>	<b>3 Punkte</b>
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	< 2,0	2,0-3,0	> 3,0
<b>Albumin (g/dl)</b>	> 3,5	3,0-3,5	< 3,0
<b>Quick (%)</b>	> 70	40-70	< 40
<b>Aszites</b>	-	leicht	schwer zu behandeln
<b>Enzephalopathie</b>	-	gering	fortgeschritten
	<b>Child A</b>	<b>Child B</b>	<b>Child C</b>
<b>Punktsumme</b>	5-6	7-9	10-15

Mithilfe des Child-Turcotte-Pugh-Scores lässt sich eine Voraussage hinsichtlich der 1-Jahres-Überlebensrate des Patienten machen (Tab.3):

Tabelle 3: 1-Jahres-Überlebensrate nach Child-Turcotte-Pugh-Score (nach Bahr, 1999).

<b>Child-Score</b>	<b>1-Jahres-Überlebensrate</b>
A	100%
B	84%
C	36%

Der MELD-Score wird mithilfe der folgenden Laborparameter errechnet: Serum-Kreatinin (mg/dl), Bilirubin gesamt (mg/dl) und INR (international normalized ratio). Diese Laborwerte werden in die folgende Formel eingesetzt (ln = logarithmus naturalis):

$10 [0,957 \ln (\text{Kreatinin i.S.}) + 0,378 \ln (\text{Bilirubin ges.}) + 1,12 \ln (\text{INR}) + 0,643]$
--

Der MELD-Score ermöglicht durch seine Skala von 6 bis 40 eine differenziertere Abstufung des Zirrhosegrades. Er gibt die 3-Monats-Mortalität von Patienten an (Tab.4):

Tabelle 4: 3-Monats-Mortalität nach MELD-Score (nach Jung, 2008)

<b>MELD-Score</b>	<b>3-Monats-Mortalität</b>
6	1 %
20	11%
30	49%
40	98%

### 1.1.7 Pathogenese der Leberzirrhose

Im gesunden Lebergewebe stehen Produktion und Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) im Gleichgewicht (Abb.1). Normalerweise macht die EZM etwa 3% des Lebergewebes aus und findet sich in der Glisson-Trias, in portalen Ausführungsgängen, um die Zentralvenen und im Disse-Raum (Geerts, 2001). Im Wesentlichen setzt sich die EZM aus Kollagen, Proteoglykanen, Laminin, Fibronectin und matrizellulärem Protein zusammen. Im Disse-

Raum finden sich vor allem Basalmembranproteine (Kollagen IV, VI). Durch chronische Leberschädigung wird dieses Gleichgewicht jedoch gestört: Es wird mehr EZM synthetisiert als abgebaut wird; in der Folge kommt es zur Leberfibrose (Abb.2), die zu einer qualitativen und quantitativen Änderung der Zusammensetzung der EZM führt. Während des Prozesses der Fibrosierung werden die Basalmembranproteine zerstört und durch fibrilläre Kollagene (Kollagen I, III und Fibronektin) ersetzt. Hierdurch wird der Stoffaustausch zwischen dem Blut der Portalvenen und den Hepatozyten behindert, was in Leberfunktionsstörungen resultiert (Gressner, 1995; Olaso, 2001; Hernandez-Gea, 2011).

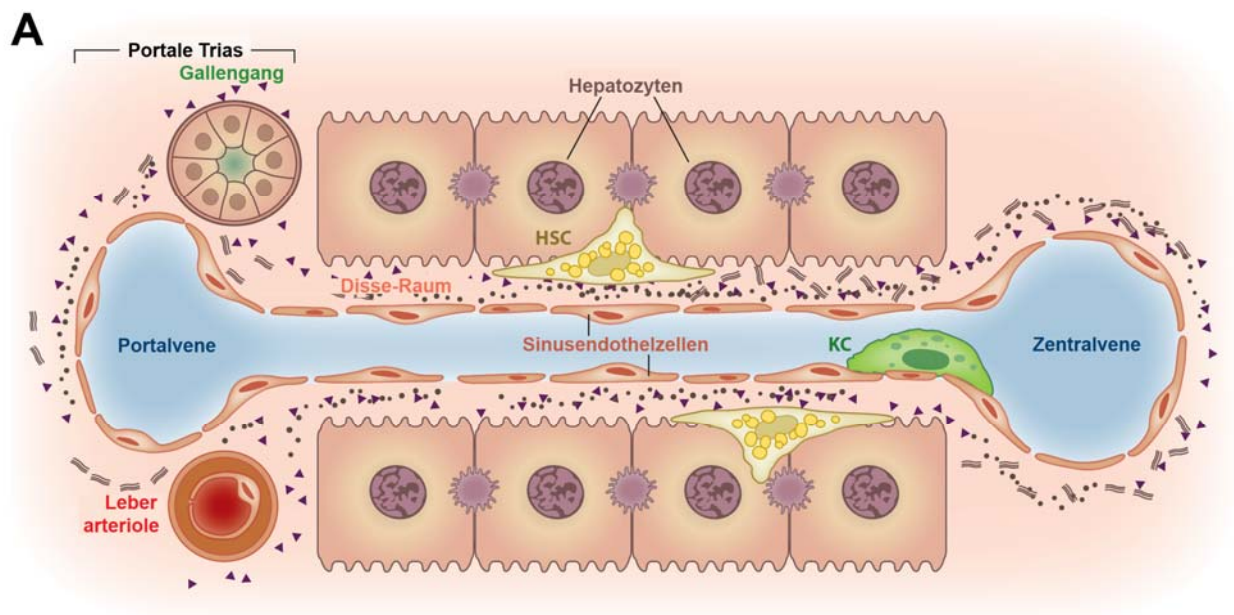


Abbildung 1: Normale Leber. In der gesunden Leber ruhen die Hepatischen Sternzellen (HSC), die Extrazellulärmatrix wird gebildet aus einem Gleichgewicht von fibrillären und Membran-Kollagenen sowie Glykokonjugaten. HSC = Hepatische Sternzelle; KC = Kupffer-Zelle. Modifiziert nach Hernandez-Gea, 2011.

Die EZM fördert außerdem die Aktivierung und Proliferation der hepatischen Sternzellen (HSC), die dann zur Proliferation von Narbengewebe führen (Schuppan, 2001). HSC sind mesenchymale Zellen, die im Disse-Raum lokalisiert sind. Durch chronische Einwirkung von Noxen beginnen sie zu proliferieren und sich zu kontrahieren; weiterhin produzieren sie proinflammatorische, profibrogenetische und promitotische Zytokine. Dabei werden die HSC in einem Transformationsprozess in Myofibroblasten überführt, die die überschießende Produktion von EZM aufrechterhalten (Friedmann, 2008).



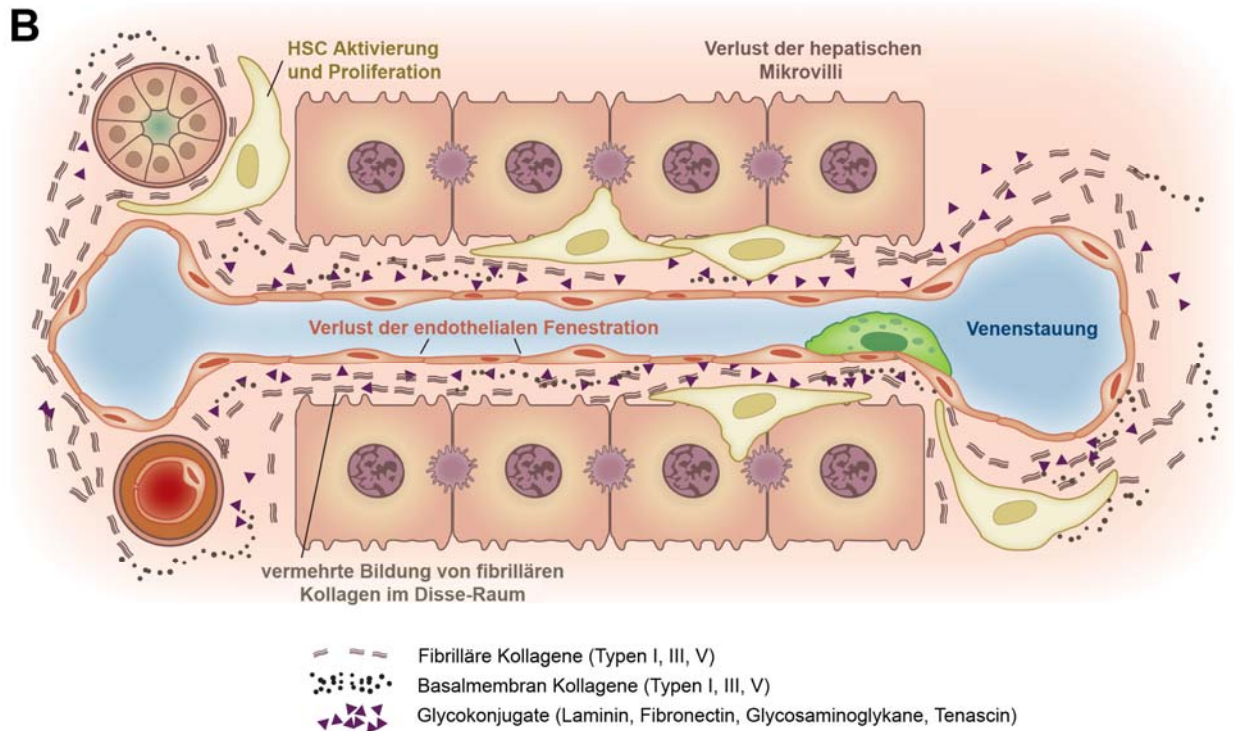


Abbildung 2: Hepatische Fibrosierung. In der fibrotischen Leber proliferieren die HSC, die Menge an Kollagenen überwiegt in der EZM und es kommt zu einer Malformation der Venen; die Fenestration der Sinusoide wird durch das Kollagen blockiert. HSC = Hepatische Sternzelle. Modifiziert nach Hernandez-Gea, 2011.

Die Population der Myofibroblasten, die sich im Verlauf der Leberschädigung entwickelt, entstammt zum größten Teil den HSC (Friedmann, 2010). Weitere Zellen, die myofibroblastische Eigenschaften entwickeln, seien im Folgenden aufgezählt:

1. Portale Fibroblasten sind im Bindegewebe der Portalfelder lokalisiert. Ihre Rekrutierung und Aktivierung zu Myofibroblasten spielt insbesondere bei ischämischen und cholestatischen Lebererkrankungen eine Rolle (Novo, 2009).
2. Auch aus dem Knochenmark stammende Myofibroblasten-ähnliche Zellen sowie zirkulierende Fibrozyten fördern die Progression der Leberfibrosierung bei chronischer Schädigung (Russo, 2006). Ihr Anteil an der Fibrosierung wird als eher gering eingeschätzt (Higashiyama, 2009).
3. Epitheliale Zellen können ebenfalls zum Ersatz von untergegangenen Hepatozyten oder zur Regeneration von geschädigtem Lebergewebe dienen. Im Rahmen eines Prozesses, der EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) genannt wird, verlieren sie ihre polaren

Eigenschaften und erlangen dafür Fähigkeiten mesenchymaler Zellen, wie Migration und Invasion, Apoptoseresistenz und Produktion von EZM (Choi, 2009).

Von den genannten Mechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit der Prozess der EMT im Rahmen der Fibrosierung des humanen Lebergewebes genauer untersucht.

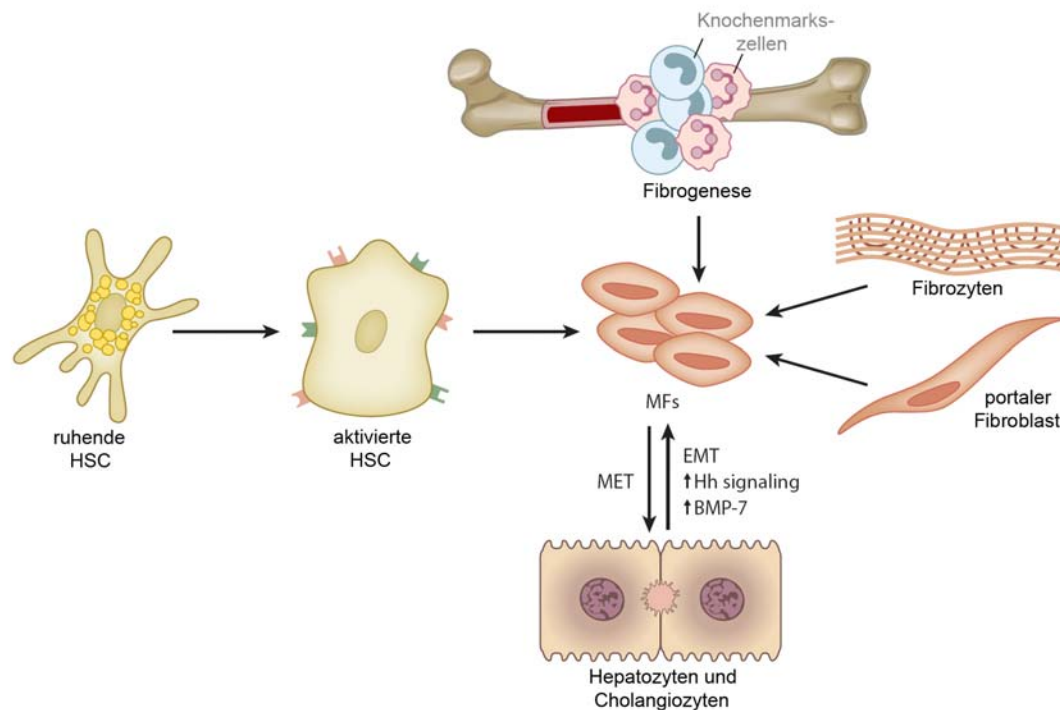


Abbildung 3: Ursprung von Myofibroblasten im Rahmen der Leberfibrose. Die Proliferation kontraktiler und Kollagen-produzierender Myofibroblasten spielt eine zentrale Rolle bei der Fibrogenese der Leber; sie entstehen zum Großteil aus aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC). Andere Zellen, die zu Myofibroblasten transdifferenzieren können, sind Knochenmarkszellen, portale Fibroblasten und EMT von Hepatozyten und Cholangiozyten. HSC = Hepatische Sternzelle; MF = Myofibroblast; MET = Mesenchymal to Epithelial Transition; EMT = Epithelial to Mesenchymal Transition; Hh = Hedgehog; BMP = Bone morphogenetic protein. Modifiziert nach Hernandez-Gea, 2011.

## 1.2 EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition)

Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) ist ein biologischer Prozess, der dazu führt, dass epitheliale Zellen ihre epithelspezifischen Eigenschaften verlieren und sich in Zellen mit mesenchymalen Phänotyp umwandeln (Abb.4). Epitheliale Zellen sind normalerweise polar

ausgerichtet und über Zell-Zell- und Zell-Membran-Kontakte fest in ihrem Zellverband verankert. Durch EMT erlangen die Epithelzellen die Fähigkeit, sich aus dem Zellverband zu lösen und zu migrieren. Außerdem entwickeln sie eine erhöhte Apoptose-Resistenz und produzieren vermehrt Komponenten der Extrazellulärmatrix (Kalluri, 2003).

Für eine vollständige EMT sind viele biochemische Prozesse notwendig, die dazu dienen, die Epithelzellen von der Basalmembran zu lösen und sie in mesenchymale Zellen umzuwandeln. Dazu zählen die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Produktion spezieller Zelloberflächenproteine, die Reorganisation und Expression von Zytoskelett-Proteinen sowie die Produktion von Enzymen, die die Extrazellulärmatrix degradieren (Kalluri, 2009).

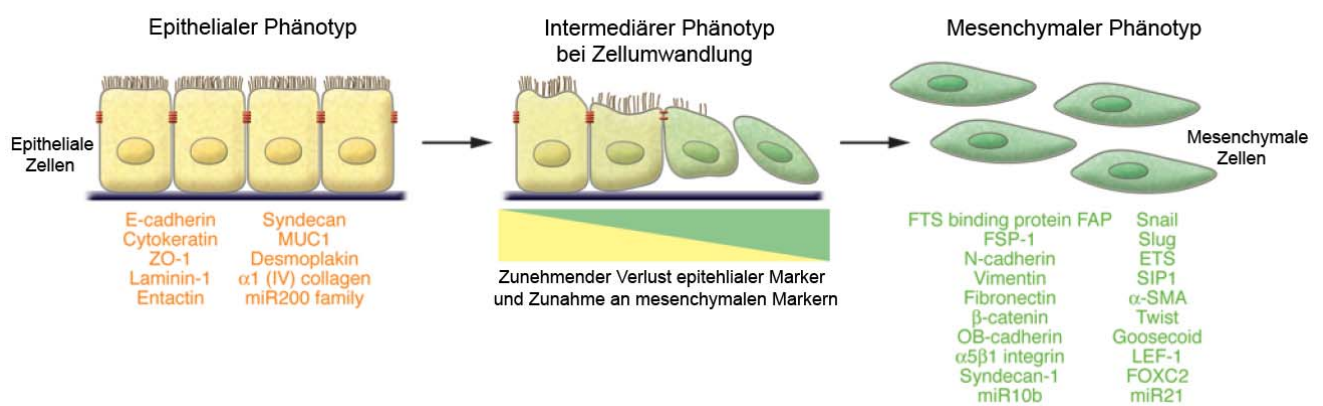


Abbildung 4: Schema des EMT-Prozesses. Die epithelialen und mesenchymalen Zellmarker, die üblicherweise verwendet werden, um EMT nachzuweisen, sind rot (epithelialer Marker) bzw. grün (mesenchymaler Marker) hinterlegt. Modifiziert nach Kalluri, 2009.

## 1.2.1 EMT-assoziierte Prozesse

Die biologischen Prozesse, bei denen EMT eine Rolle spielt, sind sehr unterschiedlich und umfassen im Wesentlichen Organogenese, Organfibrosierung und Metastasierung:

EMT-Zellen besitzen die Fähigkeit, mesenchymale Zellen zu generieren. Diese mesenchymalen Zellen können im Anschluss eine MET (Mesenchymal to Epithelial Transition) unterlaufen, um sekundäre Epithelien zu bilden, die von zentraler Bedeutung für die Implantation des Embryos, die Entwicklung und polare Ausrichtung der Plazenta und die Organogenese sind.

Des Weiteren spielt EMT eine Rolle bei Wundheilungsprozessen, Geweberegeneration und Fibrosierung von Organen. Im Rahmen von diesen Reparationsvorgängen sorgt die EMT

dafür, dass Fibroblasten und Fibroblasten-ähnliche Zellen entstehen. Diese sorgen dann für die Regeneration von Geweben, die durch entzündliche oder traumatische Prozesse geschädigt wurden. Diese EMT-Prozesse hören mit dem Ende der Schädigung auf, was einer normalen Wundheilung entspricht. Bei anhaltender Schädigung jedoch kann es durch EMT zur Fibrosierung und Destruktion von Organen kommen. Dies entspricht der Vorstellung von der Fibrosierung als eine „Wunde, die niemals heilt“.

EMT ist darüber hinaus bei neoplastischen Zellen zu finden, die zuvor bereits genetische und epigenetische Veränderungen durchlaufen haben. Diese Veränderungen führen zu einer Aktivierung von Onkogenen und einer Inhibition von Tumorsuppressorgenen. Im Rahmen dieser Prozesse kommt es auch zur Aktivierung von EMT: Die Tumorzellen können sich aus ihrem Verband lösen und durch ihre neu erworbene Migrationsfähigkeit umliegendes Gewebe invadieren oder auch in weiter entfernt gelegene Gewebe metastasieren (Kalluri, 2009).

### **1.2.2 EMT und Snail**

Wie in Kap.1.2 erwähnt, führt die EMT auf molekularem Wege dazu, dass eine Zelle ihre Polarität verliert. Zu den Proteinen, die die polare Ausrichtung einer Zelle ermöglichen, zählen in erster Linie Zelladhäsionsproteine (E-Cadherin, Integrine, Occludine), Ankerproteine (Claudine) und Kanalproteine (Connexine). Als wichtigster Prozess im Rahmen der EMT wird der Verlust von E-Cadherin angesehen. Mehrere Transkriptionsfaktoren sind beschrieben worden, die zu einer Repression von E-Cadherin führen (Zinkfingerproteine der Snail/Slug-Familie, Twist, ZEB1, SIP1, und der Faktor E12/E47). Snail zählt unter diesen Transkriptionsfaktoren als wichtigster Inhibitor der Transkription von E-Cadherin (Nieto, 2002). Auch die Expression anderer Epithelproteine wie Claudine und Occludine wird von Snail unterdrückt. Gleichzeitig induziert es die Expression von Genen, die mit einem mesenchymalen Phänotyp assoziiert sind, wie Fibronektin und MMP9 (Wu, 2010). Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung für die Fibrogenese wurde in der folgenden Arbeit die Expression der mRNA von Snail als wichtigster Vertreter der EMT-Marker in fibrotischen und zirrhotischen Lebergeweben untersucht.

## 1.3 Snail

### 1.3.1 Expression und Struktur von Snail

Snail ist ein Transkriptionsfaktor, der über Zinkfingerdomänen arbeitet. Zur Snail-Familie zählen Snail 1 (Snail), Snail 2 (Slug) und Snail 3 (Smuc). Sie besitzen jeweils 4-6 Zinkfinger in ihrem C-terminalen Ende, die sequenzspezifisch mit der DNA interagieren können. Am N-terminalen Ende befindet sich die sogenannte SNAG-(Snail/Gfi) Domäne, die der Repression der Transkription dient (Nieto, 2002).

Snail spielt eine Rolle bei der Embryogenese, aber auch bei der Entstehung von Tumoren, wo es als Stimulator der EMT gilt. Des Weiteren ist Snail in das Zellüberleben, die Regulation der Immunantwort und die Stammzellbiologie involviert.

Snail wird vor allem in neoplastischen epithelialen Zellen exprimiert. Außerdem wird es von fibroblastischen Zellen in entzündlich oder tumorös veränderten Geweben, in neoplastischen mesenchymalen Zellen und in aktivierten Makrophagen produziert (Wu, 2010).

### 1.3.2 Regulierung von Snail

Snail ist ein instabiles Protein, dessen Halbwertszeit von stabilisierenden Proteinen und seiner Lokalisation in der Zelle abhängig ist. Snail muss in den Zellkern translozieren, um als Transkriptionsfaktor zu fungieren. Zytoplasmatisches Snail wird rasch phosphoryliert und ubiquitiniert, wodurch es eine sehr kurze Halbwertszeit hat. Das Zytokin TNF- $\alpha$  scheint die Stabilität von Snail zu garantieren.

Die Expression von Snail wird stimuliert durch die Aktivierung von Tyrosinkinasen wie zum Beispiel FGF und EGF. Auch Signalwege, die eine Rolle in der Embryogenese und Fibrogenese spielen, können Snail regulieren: So stimuliert TGF- $\beta$ /Smad die Expression von Snail, indem es direkt an den Snail-Promoter bindet. In der Folge kommt es zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (EMT), z.B. in Hepatozyten und in mesothelialen Zellen (Wu, 2010).

### **1.3.3 EMT/ Snail in der Leber**

Auch in der Leber, einem Organ mit einer hohen Regenerationsfähigkeit, konnte EMT nachgewiesen werden. Je nach Schweregrad und Dauer der Gewebeläsion spielen bei der Regeneration unterschiedliche Zellen eine Rolle: Nach akuter partieller Hepatektomie sind es die verbleibenden reifen Hepatozyten und Cholangiozyten, bei chronischer Leberschädigung auch hepatische Progenitorzellen, welche ihren Ursprung in den Hering-Kanälchen haben. Es wird vermutet, dass für diese Regenerationsvorgänge auch immer Veränderungen der Epithelzellen notwendig sind. In der Leber führt eine Regeneration nach chronischer Schädigung zu fibrotischen Umbauprozessen, die Leberzellfunktion und Leberzirrhose bewirken können. Daher könnte die Untersuchung von EMT im Lebergewebe langfristig zu neuen therapeutischen Interventionen führen. Als Zellen, die in vitro EMT durchlaufen, sind Hepatozyten, Cholangiozyten und hepatische Sternzellen beschrieben (Choi, 2009)

Untersuchungen weisen darauf hin, dass in fibrotischen Lebern mittels EMT Fibroblasten aus Hepatozyten entstehen. Hierzu wurde eine Akkumulation von fibroblastischen Zellen mit EMT-Markern, in diesem Fall FSP-1 (Fibroblast specific protein), und co-exprimierten Markern von Hepatozyten in fibrotischen Lebern nachgewiesen (Zeisberg, 2007).

Untersuchungen der Expression von Snail1 nach chronischer Leberschädigung ergaben, dass Snail in murinen und humanen Leberfibrosen hochreguliert war. Die Expression von Snail geht in vitro von hepatischen Sternzellen aus; aktivierte Sternzellen wiesen im Zellkern transloziertes, also biologisch aktives Snail auf (Scarpa, 2011).

Eine erhöhte Expression von Snail mRNA wurde auch im HCC-Gewebe bei gleichzeitigem Verlust von E-Cadherinen nachgewiesen. Dies lässt eine Rolle von EMT im Rahmen der HCC-Entstehung vermuten (Sugimachi, 2003). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Snail mRNA-Serumkonzentration bei Patienten mit HCC mit dem Vorkommen von extrahepatischen Metastasen assoziiert ist (Min, 2009).

## **1.4 Inflammation und Leberzirrhose**

Neben der Aktivierung von hepatischen Sternzellen und EMT-Markern, die durch ihren Einfluss auf Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Leberzirrhose zu spielen scheinen, sind noch weitere Faktoren im Rahmen der Zirrhoseentstehung zu nennen: So hat auch eine chronische Gewebeinflammation – nicht nur in der Leber – eine

Fibrosierung zur Folge, die wiederum zu Organdysfunktion bis hin zu Organversagen und/oder Karzinogenese führt. Eine Schlüsselrolle bei diesem Prozess spielen inflammatorische Zytokine, die von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden können (z.B. Hepatozyten, hepatische Sternzellen, natürliche Killerzellen). Die Zytokine umfassen eine große Gruppe von Proteinen, die u.a. Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren und Interleukine einschließt (Hernandez-Gea, 2011). Unter den Zytokinen war bisher vor allem IL-6 als im Zusammenhang mit Leberfibrosierung stehend bekannt. IL-6 wird bei chronischer Leberschädigung von T-Zellen und hepatischen Sternzellen exprimiert und fördert die Aktivierung der hepatischen Sternzellen (Bataller, 2005).

Inzwischen ist bekannt, dass auch weitere Interleukine an der Fibrogenese mitwirken. Der Fokus richtet sich hierbei zunehmend auf IL-15, ein erst 1994 entdecktes Zytokin, das inzwischen als potentieller Angriffspunkt hinsichtlich der Entwicklung einer Anti-Tumor-Therapie erforscht wird (Cheever, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde daher neben der Expression von Snail mRNA die Expression von IL-15 mRNA in humanen Lebergewebeproben untersucht.

## **1.5 Interleukin-15**

Interleukin-15 (IL-15) ist ein Zytokin, das in vielen Organen kontinuierlich von immunologischen und nicht-immunologischen Zellen exprimiert wird. Es ist ein Überlebenssignal für Lymphozyten, NK- und NKT-Zellen, stimuliert Zellproliferation, verhindert Apoptose und fördert die Zelldifferenzierung vieler nicht-immunologischer Zellen. Es ist bekannt, dass IL-15 eine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis spielt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-15 bei Patienten mit Leberschädigung durch chronische Hepatitis C-Infektion mit zunehmender Gewebeschädigung ansteigt. Dennoch ist die genaue Funktion von IL-15 in der Leber noch weitestgehend unbekannt (Suzuki, 2006).

### **1.5.1 Struktur und Expression von IL-15**

IL-15 ist ein ca. 15 kDa schweres Zytokin, das der Familie der 4 $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine zuzuordnen ist, zu der auch IL-2, IL-3, IL-6 und IL-7 gehören (Grabstein, 1994). Das Gen, das für IL-15 kodiert, hat eine geschätzte Größe von 34 kb und liegt auf Chromosom 4q31.

Es kodiert für zwei verschiedene mRNA-Isoformen: Die klassische LSP-IL-15 mRNA mit einem 48-Aminosäuren langen Signalpeptid (Long signal peptide), und die später entdeckte Isoform, die alternative SSP-IL-15 mRNA mit einem kurzen Signalpeptid (Short signal peptide, 21 Aminosäuren lang), die durch alternatives Spleißen entsteht (Nishimura, 2000). Beide mRNA-Isoformen kodieren jedoch für das gleiche reife Protein.

Die beiden IL-15 mRNA-Isoformen sind unterschiedlich lokalisiert: LSP-IL-15 findet sich in den sekretorisch aktiven Zellkomponenten (endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat), SSP-IL-15 hingegen im Zytoplasma und im Zellkern. SSP-IL-15 mRNA wird vor allem in Herz, Thymus, Appendix und im Hoden exprimiert, während LSP-IL-15 mRNA in Skelettmuskel, Plazenta, Herz, Lunge, Leber, Thymus und Niere entsteht. Die biologische Bedeutung dieser Lokalisation ist noch nicht vollständig erforscht (Tagaya, 1997; Gaggero, 1999).

### **1.5.2 Transkriptionale und translationale Regulation von IL-15**

IL-15 mRNA lässt sich in vielen verschiedenen Gewebe- und Zelltypen nachweisen, während die Detektion von IL-15 Protein nicht äquivalent dazu möglich ist. Die Diskrepanz zwischen IL-15-Transkription und Translation des IL-15 Proteins wird durch eine komplexe und ungewöhnlich engmaschige Kontrolle der Proteinsynthese, sowie durch intrazelluläre Transport- und Translokationsmechanismen gesteuert (Fehninger, 2001; Budagian, 2006). Die strenge Regulierung der Proteinexpression könnte ihre Ursache im hohen inflammatorischen Potential von IL-15 haben, das bei Überexpression autoimmunologische oder karzinogene Prozesse fördern könnte (Fehninger, 2001; Steel, 2012).

### **1.5.3 Der IL-15 Rezeptor und seine Verbindung zum IL-2- Rezeptor**

Der IL-15 Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), unter denen allein die  $\alpha$ -Untereinheit (IL-15R $\alpha$ ) speziell für IL-15 ist (Abb.5). Die  $\beta$ -Untereinheit ist identisch mit der des IL-2 Rezeptors (IL-2/15R $\beta$ ), die  $\gamma$ -Untereinheit wiederum ist identisch mit der  $\gamma$ -Untereinheit der Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21 (Giri, 1995).

Die IL-15R $\alpha$ -Untereinheit bindet IL-15 mit hoher Affinität, eine Signaltransduktion erfolgt jedoch erst in Anwesenheit von IL-2/15R $\beta$  und der  $\gamma$ -Untereinheit (Giri, 1994). Es wurde vermutet, dass die hohe Affinität von IL-15 zu IL-15R $\alpha$  überhöhte Konzentrationen von IL-15 binden soll oder dass es zu Interaktionen mit noch unbekannten Rezeptorkomponenten kommt (Kennedy, 1996). Da eine derartig hohe Affinität bei anderen Zytokinen nicht



beschrieben ist, lässt sich vermuten, dass eine strenge Regulierung der Expression von IL-15 notwendig ist, da es sehr weitreichende Funktionen und ein hohes inflammatorisches Potential im Organismus besitzt (Lorenzen, 2006). Aufgrund der Ähnlichkeit des IL-15- und des IL-2-Rezeptors wurden für IL-15 und IL-2 ähnliche biologische Funktionen vermutet. Zwar wirken beide Faktoren stimulatorisch auf T-Zellpopulationen, jedoch agieren IL-15 und IL-2 als sehr unterschiedliche Faktoren im Rahmen des Immunsystems: Während IL-2 v.a. einen wichtigen Regulator in der T-Zell-Antwort des adaptiven Immunsystems darstellt, spielt IL-15 eine Rolle bei einem viel größeren Spektrum bioregulatorischer Prozesse (Carson, 1994; Budagian, 2006).

#### 1.5.4 Signaltransduktion von IL-15

Zu den Signalwegen, die IL-15 in Gang setzt, zählen die Aktivierung der Januskinase (Jak), einer humanen Tyrosinkinase, sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT (=Signal transducer and activator of transcription): Die Bindung von IL-15 an seinen Rezeptor führt sowohl zur Phosphorylierung des Rezeptors, wie auch von JAK1 und JAK3. Im Anschluss bindet STAT5 an den phosphorylierten Rezeptor und wird dabei selbst phosphoryliert. STAT 5 dissoziiert vom Rezeptor und bildet ein Dimer. Das STAT5-Dimer transloziert in den Zellkern, wo es die Transkription der Zielgene induziert (Waldmann, 2006; s.Abb.5).

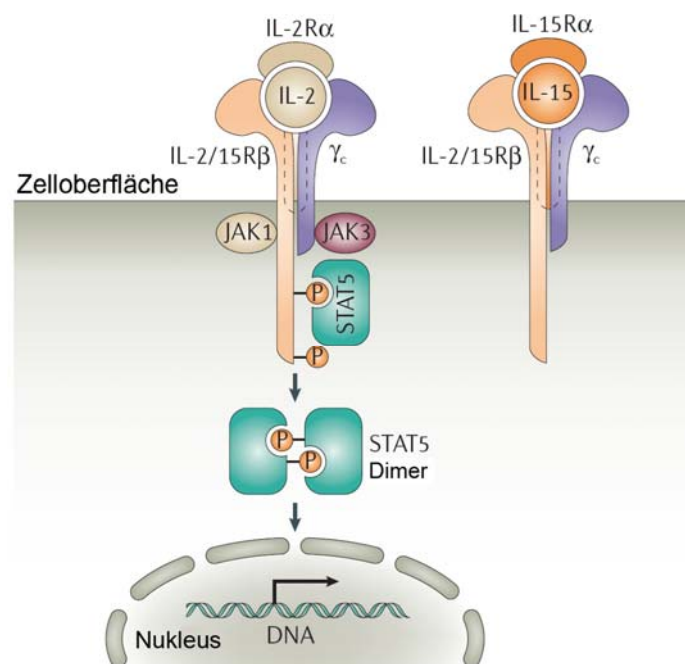


Abbildung 5: Struktur und Signalweg von IL-15 und IL-2. Jak = Januskinase; STAT = Signal transducer and activator of transcription. Modifiziert nach Waldmann, 2006.

### 1.5.5 IL-15 und immunologische Zellen

IL-15 spielt eine wichtige Rolle für die Differenzierung und das Überleben von NK-Zellen. NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und dienen der unspezifischen Abwehr von Tumor- oder virusinfizierten Zellen (Fehninger, 2001). Lange Zeit wurde angenommen, dass die NK-Zellen zur vollen Ausreifung die Umgebungsbedingungen im Knochenmark benötigen (Seaman, 1979). Analysen zeigten jedoch, dass CD34<sup>+</sup>-hämatopoetische Progenitorzellen nach Applikation von rekombinatem IL-15 eine Differenzierung funktionsfähiger NK-Zellen induzierten – in Abwesenheit von Knochenmarksstromazellen und anderen Zytokinen (Mrózek, 1996). Mäuse mit einem experimentell deletierten IL-15R $\alpha$  zeigen multiple Defekte des angeborenen Immunsystems, unter anderem fehlende milz-abstammende NK-Zellen und nicht vorhandene NK-Zytotoxizität (Lodolce, 1998). IL-15<sup>-/-</sup>-Mäuse haben weder in der Milz noch in der Leber phänotypische oder funktionelle NK-Zellen; dieser Effekt ist jedoch reversibel bei exogener Applikation von IL-15. Bei normalen Mäusen führt die Applikation von IL-15 zu einem Anstieg der NK-Zellaktivität und der Anzahl der NK-Zellen in der Milz (Kennedy, 2000). Nachdem NK-Zellen für ihre Anti-Tumor-Wirkung bekannt sind, wäre IL-15 als NK-Zell-Trigger ein interessantes therapeutisches Ziel im Rahmen der Karzinomtherapie (Colucci, 2003).

IL-15 und IL-12 zusammen induzieren die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die beide makrophagenstimulierend wirken (Ross, 1997). IL-15 alleine ist ein potenter Stimulator der Produktion von GM-CSF (Carson, 1994). Makrophagen, die mit IFN- $\gamma$  aktiviert wurden, exprimieren selbst IL-15. Studien mit humanen Co-Kulturen von aktivierten Makrophagen und NK-Zellen zeigten, dass das endogene von den Makrophagen produzierte IL-15 in Zusammenarbeit mit IL-12 entscheidend ist für eine optimale Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen (Carson, 1995). In in-vivo-Experimenten resultierte aus einer Antikörper-vermittelten Blockade von IL-2/15R $\beta$  oder IL-15 eine signifikante Reduktion von IFN- $\gamma$  (Fehninger, 2000). Dadurch kann auf eine Interaktion zwischen Makrophagen und NK-Zellen mittels eines parakrinen Feedbackmechanismus geschlossen werden (Abb.6): Die Makrophagen produzieren u.a. IL-15 und IL-12, die an Oberflächenrezeptoren der NK-Zellen binden. In der Folge kommt es zur Freisetzung von Faktoren, v.a. von IFN- $\gamma$ , die ihrerseits Makrophagen-stimulierend wirken. Durch Makrophagen sezerniertes IL-15 steht also - zusammen mit anderen Monokinen – am Beginn der proinflammatorischen Kaskade, die die endogene IFN- $\gamma$ -Produktion zur Folge hat (Fehninger, 2001). IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin, das in nahezu allen Phasen der Entzündungsreaktion und der Immunantwort eine Rolle spielt (Farrar, 1993). Eine Modulation der Produktion von IL-15 würde demnach einen sehr

weitreichenden Effekt nach sich ziehen; ein entsprechender therapeutischer Angriffspunkt wäre hier denkbar.

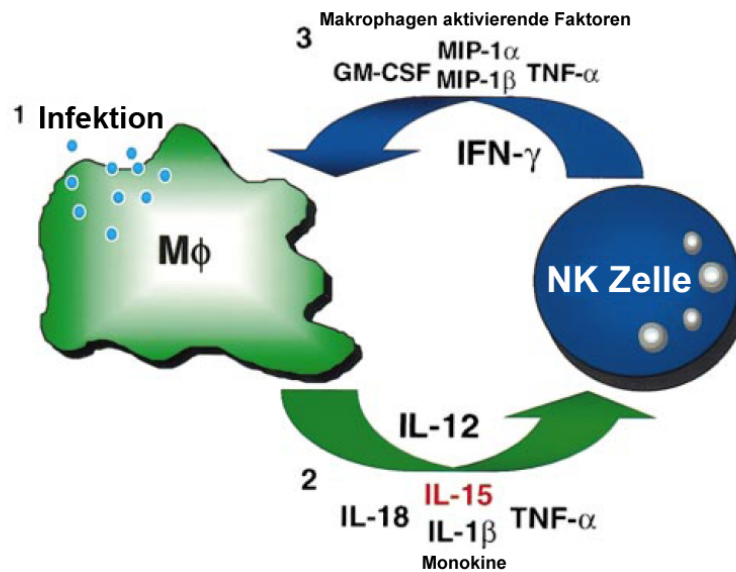


Abbildung 6: Wechselwirkung zwischen Makrophagen, IL-15 und NK- Zellen. Eine Infektion (1) führt zu einer Produktion von Monokinen durch Makrophagen (u.a. IL-15) (2), die an entsprechende Rezeptoren an der NK-Zelloberfläche binden. Die NK-Zellen produzieren daraufhin Zytokine (3), die wiederum die Makrophagen stimulieren. Mφ = Makrophage; MIP = Macrophage inflammatory protein; TNF = Tumornekrosefaktor; GM-CSF = Granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Modifiziert nach Fehninger, 2001.

Humane Makrophagen exprimieren bei Konfrontation mit einem Pathogen (z.B. LPS) hochaffine IL-15 Bindungsstellen (Giri, 1994). Über einen autokrinen Mechanismus werden in Abhängigkeit von der IL-15 Konzentration proinflammatorische Zytokine durch die Makrophagen produziert. Eine hohe IL-15-Konzentration induziert eine hohe Zytokinproduktion, eine niedrige Konzentration hingegen bewirkt eine Suppression (Alleva, 1997). IL-15 scheint daher auch bei der Etablierung der angeborenen Immunantwort und der Aufrechterhaltung des makrophagengesteuerten inflammatorischen Prozesses eine wichtige Rolle zu spielen (Fehninger, 2001).

### 1.5.6 IL-15 und nicht-immunologische Zellen

Neben immunologischen Zellen konnte eine IL-15 Expression auch in mehreren nicht-immunologischen Zellen detektiert werden. So wirkt IL-15 als anaboler Faktor für die Skelettmuskulatur und fördert die Proliferation von Darmepithelzellen sowie die Angiogenese in Gefäßendothelzellen (Quinn, 1995; Reinecker, 1996; Angiolillo, 1997). Im Rahmen

chronisch-entzündlicher Erkrankungen konnte eine erhöhte Konzentration von IL-15 in den Synovialzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis, in Alveolarzellen von Patienten mit einer aktiven Sarkoidose sowie in den peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit einer aktiven Colitis ulcerosa festgestellt werden (Kirman, 1998).

1997 wurde die Serumexpression von IL-15 bei Patienten mit chronischer Hepatitis C untersucht. Die IL-15-Serumkonzentration der Patienten mit chronischer Hepatitis C, Leberzirrhose und HCC ist im Vergleich zu den Lebern von gesunden Patienten deutlich erhöht. Die IL-15-Konzentration korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung, sodass IL-15 einen Faktor darstellen könnte, der den Entzündungsgrad der Leber widerspiegelt (Kakumu, 1997). 2006 wurde die Expression von IL-15 und seinen Rezeptoren in verschiedenen murinen Leberschädigungsmodellen, primären Hepatozyten und zwei hepatischen Zellkultur-Linien untersucht. Es zeigt sich eine kontinuierliche Expression von IL-15 in normalen Lebergeweben, die bei einer Gewebeschädigung ansteigt. Es wird daher vermutet, dass IL-15 einen regenerativen Faktor im Lebergewebe darstellt (Suzuki, 2006). Mittels immunhistochemischer Färbung lässt sich IL-15 vor allem im Portaltrakt nachweisen; auch parenchymale Zellen, bei denen es sich am ehesten um Kupffer-Zellen handelt, und mononukleäre Zellen, am ehesten Monozyten, sind positiv für IL-15 (Golden-Mason, 2004). Eine Analyse der Expression von IL-15 in peritumoralen Geweben von HCC-Herden und im HCC-Gewebe direkt zeigte, dass vor allem das Zytoplasma von Hepatozyten und Tumorzellen, aber nur wenige Lymphozyten, IL-15 produzieren (Zhou, 2010).

### **1.5.7 Potentielle therapeutische Strategien mit IL-15**

Aus den bisherigen Forschungsergebnissen lassen sich für zukünftige therapeutische Optionen folgende Strategien ableiten: Einerseits die Verstärkung der Immunantwort durch exogen zugeführtes IL-15 und andererseits die Herabregulierung des Immunsystems durch die Eliminierung von unangemessen hohen IL-15 Konzentrationen.

Es gibt bereits mehrere Zytokine, die in rekombinant hergestellter Form therapeutische Anwendung finden, wie Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF, IFN- $\alpha$  und IL-2. Es besteht die Hoffnung, durch exogene Applikation von IL-15 die Proliferation von Lymphozyten bei Patienten mit Immundefizienz und Karzinomen zu fördern. Voraussetzung ist, dass IL-15 in vivo die gewünschten Funktionen (Proliferation, Differenzierung und Überleben von NK-Zellen u.a.) bei tolerablen Nebenwirkungen ausführt. Durch den gemeinsamen Rezeptor von IL-2 und IL-15 scheinen Voraussagen über eine IL-15-in-vivo-Anwendung möglich. IL-2 ist

seit 1992 von der Food und Drug Administration (FDA) in den USA zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms, seit 1998 auch zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms, zugelassen. IL-15 und IL-2 besitzen hochaffine Rezeptorkomplexe, die im menschlichen Organismus jedoch völlig verschiedene Expressionsprofile haben. Es wird vermutet, dass exogen appliziertes IL-15 in weitaus geringerer Dosis als IL-2 Immunzellen stimuliert, was die Toxizität verringern würde (Fehninger, 2001).

### 1.5.8 IL-15 und Leberfibrose/-zirrhose

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jan Hengstler am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung der Technischen Universität Dortmund wurde zur Analyse des Zusammenhangs von IL-15 und Leberfibrose die IL-15 mRNA Expression im Mausmodell untersucht. Hierzu wurde Mäusen 6 Wochen lang dreimal wöchentlich 1 ml Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ) pro kg Körpergewicht gelöst in Maiskeimöl injiziert.  $\text{CCl}_4$  ist eine anorganische Verbindung, die durch Cytochrom P450-Enzyme metabolisiert wird. Dabei entstehen hepatotoxische Zwischenprodukte, die eine Nekrose und Apoptose der Hepatozyten bewirken, was wiederum zur Leberfibrose führt.  $\text{CCl}_4$  ist spezifisch toxisch für Hepatozyten und wird deshalb in Mausmodellen zur Leberfibrose eingesetzt.

In Abb.7 ist das Ergebnis der Untersuchungen dargestellt: Zunächst wurde die Expression von Kollagen-I mRNA im Lebergewebe der mit  $\text{CCl}_4$  behandelten Mäusen sowie in einer Kontrollgruppe, die nur mit Maiskeimöl behandelt wurde, analysiert.

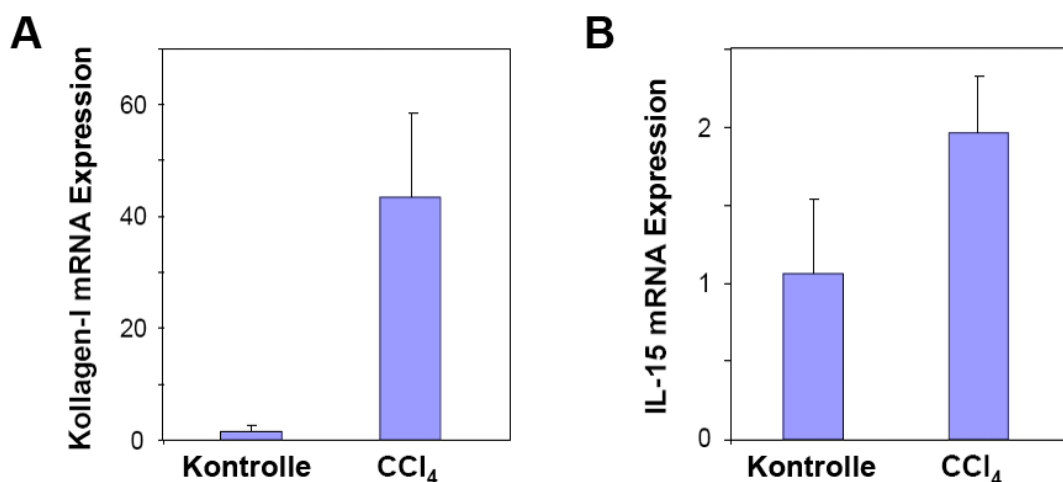


Abbildung 7: Modell der chronischen Leberschädigung an murinen Lebergeweben (n=3) durch  $\text{CCl}_4$ , welches zur Fibrosierung führt. A) Mäuse, die mit  $\text{CCl}_4$  behandelt wurden, zeigen eine signifikant erhöhte Expression an Kollagen-I mRNA im Vergleich zu unbehandelten Tieren. B) In den fibrotisch veränderten Lebergeweben der mit  $\text{CCl}_4$  behandelten Mäuse kann eine deutlich erhöhte Expression an IL-15 mRNA im Vergleich zu unbehandelten Tieren nachgewiesen werden.

Eine erhöhte Kollagen-I mRNA Expression ist als eingetretene Gewebefibrosierung zu werten. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigen die Lebergewebe der mit CCl<sub>4</sub> behandelten Mäuse eine signifikant erhöhte Kollagen-I mRNA Expression (Abb.7A). Bei der Analyse der IL-15 mRNA Expression konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL-15 mRNA bei den CCl<sub>4</sub>-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb.7B).

Um einen potentiellen kausalen Zusammenhang zwischen IL-15 und Fibrogenese nachzuweisen, wurde im folgenden Versuch CCl<sub>4</sub> nach dem oben genannten Schema an IL-15-Knockout-Mäuse (IL-15<sup>-/-</sup>) sowie an Wildtyp-Mäuse verabreicht. Nach 6 Wochen wurden die Mauslebern mit Sirius Red gefärbt. Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff, der basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Im histologischen Bild ließ sich bei den IL-15<sup>-/-</sup>-Mäusen eine deutlich geringere fibrotische Septenbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen (Abb.8). Dies unterstreicht einen möglichen Zusammenhang zwischen IL-15 und Leberfibrosierung.

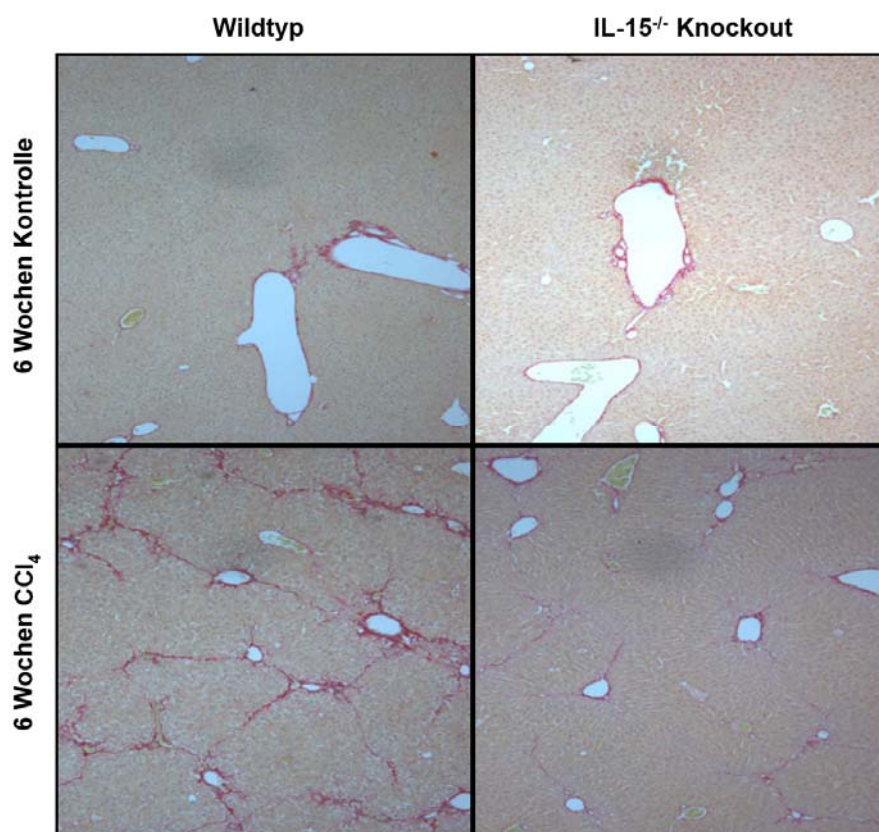


Abbildung 8: Die Lebergewebe von Wildtyp-Mäusen und IL-15<sup>-/-</sup>-Mäusen im chronischen CCl<sub>4</sub>-Modell. Die Gewebefärbung erfolgte mit Sirius Red zur Darstellung der Fibrosierung. Die oberen beiden Grafiken bilden die Lebergewebe der unbehandelten Mäuse ab, die unteren beiden Grafiken die der IL-15<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich. 6 Wochen nach Beginn der CCl<sub>4</sub>-Injektionen lässt sich im Lebergewebe der IL-15<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich weniger Fibrosierung als im Gewebe des Wildtyps nachweisen.

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Die Leberzirrhose ist eine sowohl in Deutschland als auch auf internationaler Ebene weit verbreitete und schwer therapierbare Erkrankung. Die bisherigen Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie weisen noch deutliche Defizite auf. Im Rahmen der Diagnostik und der Verlaufskontrolle von Erkrankungen spielen Biomarker zunehmend eine wichtige Rolle. Als Biomarker werden biochemische Produkte des Organismus zusammengefasst, mithilfe derer man das Fortschreiten von Erkrankungen oder Therapieerfolge überprüfen kann. Zur Behandlung von Krankheiten stellen Antikörpertherapien inzwischen eine sehr zielgerichtete und dadurch potentiell nebenwirkungsärmere Alternative zu herkömmlichen Therapieoptionen dar. Snail und IL-15 sind Faktoren, die bereits im Zusammenhang mit der Leberzirrhose beschrieben wurden. Viele Aspekte hinsichtlich ihrer genauen Funktionsmechanismen, ihrer Expression und ihres potentiellen therapeutischen Potentials bleiben jedoch noch offen. In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob und inwieweit eine Progression von Leberfibrose und -zirrhose zum einen mit der Aktivierung von Snail im Rahmen einer möglichen EMT und zum anderen mit einer Gewebeinflammation in Form der Expression von IL-15 einhergeht. Des Weiteren wurden Snail und IL-15 unter dem Aspekt eines potentiellen Einsatzes als Biomarker im Rahmen der Leberzirrhose untersucht. Dazu wurde die Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA in humanen Lebern gemessen, die fibrotische und zirrhotische Umbauvorgänge aufweisen, sowie in gesunden Lebergeweben. Darüber hinaus wurden klinische und biochemische Daten erhoben, die bisher zur Diagnostik der Leberzirrhose herangezogen wurden, um diese auf Korrelationen mit IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression zu untersuchen. Ferner soll nachgewiesen werden, inwieweit und speziell von welchen Zellen IL-15 Protein in fibrotisch und zirrhotisch veränderten Lebergewebeproben produziert wird. Im Einzelnen wurden folgende Teilaspekte adressiert:

1. Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA und der Fibroseprogression in humanen Lebergeweben?
2. Spielt die Ätiologie der humanen Leberfibrose/ -zirrhose eine Rolle hinsichtlich der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA?

3. Bestehen Korrelationen zwischen IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression und Patientendaten bzw. Laborwerten der Patienten, und welche Aussagen lassen sich aus diesen Korrelationen ableiten?
4. Lassen die Expressionslevel von IL-15 mRNA und Snail mRNA in humanen Lebergeweben eine prognostische Einschätzung der Überlebenszeit des Patienten zu?
5. Von welchen Zellen und in welchem Ausmaß wird IL-15 Protein im Lebergewebe exprimiert?



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

Tabelle 5: Geräte und Materialien

Gerät	Herstellungsfirma
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
BioPhotometer	Eppendorf
gentleMacs™ Homogenisator	Miltenyi Biotec
M-Tubes	Miltenyi Biotec
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Chip-Priming-Station	Agilent Technologies
RNA 6000 LabChip®	Agilent Technologies
Vortex Mixer Model MS2-S8/MS2-S9	IKA®

Tabelle 6: Reagenzien

Reagenz	Herstellungsfirma
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich ®
Ethanol absolut	Roth
Isopropanol 99,9%	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich ®
RNase Away ®	Molecular BioProducts
RNAlater®	Ambion®
Qiagen RNeasy ® Maxi Kit	Qiagen
RNase Free-DNase Set	Qiagen
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewebeproben und Erhebung von Patientendaten**

Für die Arbeit wurden insgesamt 173 ungepaarte Lebergewebeproben untersucht. Von diesen Gewebeproben wiesen 27 Proben fibrotische, 22 Proben fibrotisch bis zirrhotische und 60 Proben komplette zirrhotische Veränderungen im histopathologischen Befund auf. Weitere 53 zirrhotische Gewebeproben stammen aus der tumorfreien Umgebung von hepatozellulären Karzinomen. Die Klassifizierung dieser Gewebe erfolgte anhand des Befundberichts, der im Rahmen der Leberresektion und -untersuchung vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg erstellt worden war.

Als Kontrollgruppe dienten 11 normale Lebergewebe, die keine histopathologischen Auffälligkeiten (Entzündungszellen, Verfettung, Cholestase oder Nekrosen) aufwiesen und aus dem Sicherheitsrand von chirurgisch entfernten Lebermetastasen (v.a. Filiae von kolorektalen Karzinomen) stammten.

Die untersuchten Lebergewebeproben sowie die Patientendaten, die zur Charakterisierung der Gewebeproben erhoben wurden, stammen aus einer im Auftrag der HTCR (Human Tissue & Cell Research, [www.htcr.de](http://www.htcr.de)) etablierten Gewebedatenbank. Das Einverständnis der Patienten zur Verwendung des Lebergewebes zu Forschungszwecken war präoperativ durch die HTCR eingeholt worden. Die Lebergewebeproben waren im Rahmen medizinisch indizierter Operationen entnommen worden. Die Patientendaten umfassten Angaben zur Person (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht), Diagnosen des Patienten, laborchemische Daten (GOT, GPT, GGT, AP, Quick, PTT, Bilirubin, CHE, AFP), Blutgruppe, Hepatitis- und HIV-Serologie sowie Angaben zu Suchtmittelkonsum (Alkohol/ Nikotin) und eingenommenen Medikamenten.

Diese Daten wurden im Archiv des Universitätsklinikums Regensburg überprüft und vervollständigt. Zusätzlich wurden weitere für diese Arbeit relevante Daten erhoben: In erster Linie erfolgte eine genaue Aufschlüsselung der Pathologie-Berichte über die entnommenen Gewebestücke (Cholestase, Entzündungsinfiltrate, Nekrosen, Verfettung). Des Weiteren wurden die Laborwerte zur nachträglichen Berechnung des MELD-Scores dokumentiert (Gesamt-Bilirubin, INR, Serum-Kreatinin). Mithilfe des Tumorzentrums Regensburg e.V. ([www.tumorzentrum-regensburg.de](http://www.tumorzentrum-regensburg.de)) wurden Überlebensdaten und eventuelle Todesursachen der Patienten ermittelt.

## 2.2.2 RNA-Isolation

### 2.2.2.1 Prinzip

Die Isolation der gesamten RNA aus den vorhandenen Gewebeproben erfolgte mithilfe der RNeasy Maxi Kits®. Die Lebergewebeproben wurden zunächst in einem Guanidin-isothiocyanat- und  $\beta$ -Mercaptoethanolhaltigen Puffer (RLT-Puffer) lysiert und homogenisiert. Dabei kommt es zur sofortigen Inaktivierung von RNasen. Nach Zugabe von Ethanol wurde die Probe auf die RNeasy-Säule geladen, die eine Silicagel-Membran mit RNA-spezifischen Bindungseigenschaften enthält. Durch das Ethanol werden hierbei optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran geschaffen. Die RNA kann dort mit Puffern aufgereinigt werden, bevor sie abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert wird.

### 2.2.2.2 Durchführung

#### Vorbereitung

Die Lebergewebeproben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Allen verwendeten Gewebeproben wurde vor dem Einfrieren 1 ml RNAlater® zugefügt, um die enthaltene RNA zu stabilisieren. Nach dem Auftauen wurden die Gewebe abgewogen, um die benötigte Menge an RLT-Lysepuffer abzuschätzen. Dies verhindert eine Überladung der Säulen, was zu erheblichen RNA-Verlusten und Verunreinigung führen kann. Die Anpassung der RLT-Lysepuffermenge an die Gewebemenge erfolgte nach folgendem Schema (modifiziert nach Qiagen RNeasy Protokoll, Tab.7):

Tabelle 7: Anpassung des Volumens an RLT-Puffer an die prozessierte Gewebemenge

Menge an Gewebe (mg)	RLT-Puffer (ml)
<300	7,5
$\geq 300$	15

## Homogenisierung

Die Gewebe wurden in sterilen Petrischalen mit einem Skalpell zerkleinert, um die anschließende Homogenisierung zu vereinfachen, und mit der erforderlichen Menge RLT-Puffer versetzt, der zur Zellyse führt. Der RLT-Puffer wurde zuvor mit je 1 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLT-Puffer versetzt. Das Gewebe-/RLT-Puffer-Gemisch wurde in M-Tubes gegeben (Miltenyi Biotec) und anschließend mithilfe des gentleMacs™ Homogenisator im Programm *m\_liver\_02* homogenisiert. Bei Proben, die nach der Homogenisierung noch makroskopisch sichtbare Lebergewebestücke enthielten, wurde das Programm ein zweites Mal durchgeführt. Um zu verhindern, dass die Proben sich zu sehr erwärmen, wurden sie zwischen beiden Durchläufen mit Eis gekühlt.

## RNA-Isolierung

Die homogenisierten Lysate wurden 20 min bei 4500 x g zentrifugiert, der klare Überstand wurde zur Weiterverarbeitung in ein neues 50 ml-Tube abpipettiert. Die Überstände wurden mit 70% Ethanol versetzt (Tab.8) und durch kräftiges Schütteln vermischt. Die Ethanolzugabe verbessert die Bindungskapazität der im Lysat enthaltenen RNA. Der für diesen Schritt verwendete 70%ige Ethanol wurde aus absolutem Ethanol und speziell für die Versuche hergestelltem RNase-freiem DEPC-Wasser zusammengestellt. Zur Herstellung des RNase-freien Wassers wurde 1 ml DEPC als Nukleaseinhibitor pro Liter Wasser zugegeben. Nach intensiver Durchmischung wurde die Lösung 20 min bei 121°C autoklaviert, um das DEPC zu degradieren.

Tabelle 8: Anpassung der Zugabe von Ethanol (70%) an die prozessierte Gewebemenge

Ausgangsmenge Gewebe (mg)	Ethanol (ml)
< 300	7,5
≥ 300	15

Lysaten, die bei der Abnahme des Überstandes stark an Volumen verloren hatten, wurde Ethanol in entsprechender Menge zugefügt, bis ein Gesamtvolumen von 7,5 bzw. 15 ml in der Säule erreicht war. Das Ethanol-Lysat-Gemisch wurde nun auf die RNeasy-Säulen pipettiert, wobei das Maximalvolumen von 15 ml je Säule nicht überschritten werden durfte, um die Säulen nicht zu überladen. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 3500 x g. Für

Proben, die noch Lysat-Überstände auf der Säulenmembran zeigten, wurde die Zentrifugation um weitere 5 min verlängert. Der Durchfluss wurde in separate Tubes abpipettiert und bei -80°C aufbewahrt, um etwaig durchgelaufene RNA erneut isolieren zu können. Zur Entfernung der DNA, die bei der Isolation von mRNA mit anfällt, erfolgte ein DNA-Verdau mit dem RNase-free DNase Set von Qiagen. Die Säulen wurden zunächst mit 7,5 ml RW1-Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 3500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut abpipettiert und in Tubes bei -80°C aufbewahrt. Für den DNA-Verdau wurden je 210 µl RDD-Puffer zu 30 µl DNase gegeben. Der Reaktionsansatz wurde durch vorsichtiges Umherschwenken vermischt und anschließend kurz zentrifugiert. Auf jede Säule wurden 240 µl des Reaktionsansatzes pipettiert. Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Säule nochmals mit 7,5 ml RW1-Puffer versetzt. Nach weiteren 5 min erfolgte eine Zentrifugation der Säule für 5 min bei 3500 x g. Der Durchfluss wurde erneut abpipettiert und in Tubes bei -80°C aufbewahrt. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurden die Säulen mit 10 ml RPE-Puffer (aus 1/5 RPE-Pufferkonzentrat und 4/5 Ethanol absolut) versetzt und 2 min bei 3500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut abpipettiert und in Tubes bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden nochmals 10 ml RPE-Puffer auf die Säule gegeben und diese für 10 min bei 3500 x g zentrifugiert, um die Säulenmembran zu trocknen. Der Durchfluss wurde erneut abpipettiert und in Tubes bei -80°C aufbewahrt. Die Säulen wurden in neue Tubes überführt. Um eventuell noch auf der Membran befindlichen Ethanol, das die Reinheit der RNA beeinflussen könnte, zu entfernen, wurden die Säulen über den neuen, trockenen Tubes für 3 min offen stehengelassen, sodass sich eventuell vorhandene Ethanolreste verflüchtigten. Um die RNA von der Säule zu eluieren, wurden je nach anfangs verwendeter Gewebemenge 0,8 ml (<300 mg Gewebe) bzw. 1,2 ml (≥ 300 mg Gewebe) RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben. Nach 1 min Inkubation wurde die Säule für 3 min bei 3500 x g zentrifugiert und die eluierte RNA in den Tubes aufbewahrt.

### 2.2.2.3 Quantifizierung der RNA und Analyse der Reinheit

Zur Vermessung der Konzentration wurde die eluierten RNA 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Im Spektrophotometer wurde die Absorption der RNA bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Nach der folgenden Formel lässt sich daraus die Konzentration der isolierten RNA errechnen unter der Voraussetzung, dass der Wert für die Absorption bei 260 nm bekannt ist:

$$c(RNA) = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der RNA bestimmen. Die  $A_{260}/A_{280}$  Ratio für reine RNA liegt idealerweise bei 1,8-2,0.

Geringere Werte bedeuten eine Verunreinigung der RNA durch Substanzen, die ebenfalls UV-Licht absorbieren. Hierzu zählen z.B. Proteine oder DNA. Auch Schwankungen des pH-Werts können zu einer erniedrigten Ratio führen. Der Mittelwert der  $A_{260}/A_{280}$  Ratio der bearbeiteten Proben lag in dieser Arbeit bei 1,63.

### **2.2.3 Analyse der RNA-Qualität mit dem Bioanalyzer 2100**

#### **2.2.3.1 Prinzip**

Mithilfe des Bioanalyzer 2100 lässt sich eine Kapillarelektrophorese in einem kompakten Chip-System durchführen. Die RNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Durch Vergleich mit einem externen Standard können die Größe und Konzentration der in der Probe vorhandenen RNA (u.a. 18S und 28S) bestimmt werden. Der Chip enthält Vertiefungen für die Proben, das Gel und den Größenmarker. Ein Mikro-Kanalsystem aus Glas, welches mit einem Gel-Farbstoff-Gemisch gefüllt wird, dient als Verbindung zwischen den einzelnen Vertiefungen.

#### **2.2.3.2 Durchführung**

Zunächst wurde ein Gel-Farbstoff-Gemisch, bestehend aus 32,5 µl gefilterter Gel-Matrix (Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix) und 0,5 µl Farbstoffkonzentrat (Agilent RNA Nano Dye Concentrate), hergestellt. Zum Befüllen wurde der Chip (Agilent RNA 6000 Nano Chip) in die dafür vorgesehene Chip-Priming-Station eingesetzt. 9 µl des Gel-Farbstoff-Gemischs wurden in die mit einem schwarzen „G“ markierten Vertiefungen gegeben. Mit einer in der Priming-Station integrierten Spritze wurde die Gel-Matrix mittels Druckluft in das Mikro-Kanalsystem gepresst. Nach 30 s konnte die Priming-Station wieder geöffnet werden. Die übrigen beiden mit „G“ gekennzeichneten Vertiefungen wurden mit 9 µl Gel-Farbstoff-Matrix befüllt. In einem Wärmeblock wurde der RNA 6000 Größenstandard (Agilent RNA 6000 Ladder) bei 70°C für 2 min denaturiert und sofort im Anschluss auf Eis gelagert. Jeweils 2 µl des Größenstandards sowie 7 µl des RNA-Nano-Markers (Agilent RNA 6000 Nano Marker) wurden auf den Chip geladen. In die verbleibenden 12 Vertiefungen wurden jeweils 7 µl RNA-Nano-

Marker und 1 µl der Proben gegeben. Mithilfe eines speziellen Schüttlers (IKA® Model MS2-S8/MS2-S9) wurde der Chip bei 2400 Upm 1 min gründlich durchmischt. Der Chip wurde in den Bioanalyzer 2100 eingesetzt und das Programm gestartet.

Durch laserinduzierte Fluoreszenz werden die RNA-Farbstoff-Komplexe detektiert. Die Auswertung wird als gelähnliche Bilder (Banden) und Elektropherogramme (Peaks) angezeigt. Für jede Probe wird von der Software zusätzlich eine RNA Integrity Number (RIN) erstellt. Diese soll bei der Beurteilung der Integrität bzw. Qualität der Gesamt-RNA behilflich sein. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Proben verwendet, deren RIN > 5 betrug, um eine ausreichende RNA-Qualität zu gewährleisten.

#### **2.2.4 cDNA- Synthese und qRT-PCR-Analyse**

Zur Amplifizierung der gewonnenen mRNA erfolgte eine Umschreibung in cDNA und die anschließende Analyse mittels qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) mithilfe von TaqMan-Sonden. Diese Arbeitsschritte wurden im Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der Technischen Universität Dortmund von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler vorgenommen. Die verwendeten TaqMan-Sonden von Applied Biosystems® waren: Hs99999039\_m1 Human IL15, Hs00195591\_m1 Human Snail und Hs99999904\_m1 Human PPIA.

Die mRNA-Mengen wurden mittels relativer Quantifizierung berechnet. Hierbei wurde die Menge an Snail bzw. IL-15 mRNA Expression in Relation zu einem sogenannten Housekeeping-Gen gesetzt. Housekeeping-Gene sind Gene, die in einem relativ gleich bleibenden Level exprimiert werden und meist universelle Aufgaben erfüllen. In der vorliegenden Arbeit diente PPIA (Peptidylprolylisomerase A) als Housekeeping-Gen.

#### **2.2.5 Anfertigen der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie**

Zur semiquantitativen Bestimmung der Proteinexpression von IL-15 im Lebergewebe wurden Gewebeschnitte angefertigt, die im Anschluss immunhistochemisch gefärbt wurden. Für die Analyse wurden 23 Gewebeproben mit verschiedener Ätiologie und zunehmender Fibrosierung ausgewählt.

Die Gewebe entstammten der Gewebebank im Auftrag der HTCR und waren bei -80°C gelagert worden. Mit dem Gefriermikrotom wurden jeweils 7 µm dünne Schnitte angefertigt. Die fertigen Schnitte wurden unfixiert an das Leibniz-Institut für Arbeitsforschung der Technischen Universität Dortmund zur immunhistochemischen Analyse übersandt.

### 2.2.6 Immunohistochemische Färbung von IL-15

Die immunhistochemischen Präparate wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jan Hengstler am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Hierzu wurden die Schnitte mit einem humanen IL-15-Antikörper (AF315, R&D Systems ®) inkubiert. Die Immunreaktivität wurde anschließend durch die Inkubation mit Hämatoxylin visualisiert, was eine rotbräunliche Färbung ergab. Der Grad der Färbung wurde sowohl qualitativ (Intensität der Färbung) als auch quantitativ (Anzahl der angefärbten Zellen) ausgewertet. Die Intensität der Färbung wurde in vier Gruppen eingeteilt: Keine rotbräunliche Anfärbung entspricht demnach einer Intensität von 0, die Intensität 1 beschreibt eine schwache rotbräunliche Anfärbung, 2 eine mäßige und 3 eine starke rotbräunliche Anfärbung (Tab.9).

Tabelle 9: Einteilung der Färbeintensität

<b>Grad</b>	<b>Färbeintensität</b>
0	keine Färbung
1	schwache Färbung
2	mäßige Färbung
3	starke Färbung

Die Anzahl der positiven Zellen wurden in Prozentangaben angegeben (0-100%). Weniger als 10% positive Zellen wurden als negative Färbung gewertet.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Excel ® (Version 2003) und IBM SPSS® 19.0. Für die im Ergebnisteil abgebildeten Boxplot-Diagramme gilt folgende Legende (Abb.9):



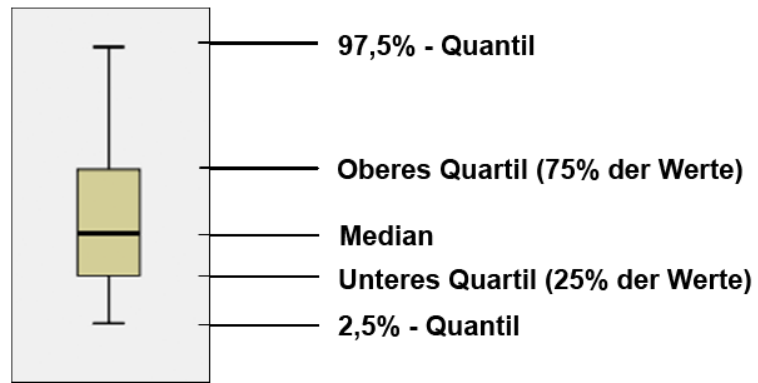


Abbildung 9: Legende zur Darstellung der Boxplot-Diagramme

Die Werte über 97,5% und unter 2,5% (Ausreißer) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in den Diagrammdarstellungen aufgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Eigenschaften der Gewebeproben

Insgesamt wurden 173 Lebergewebeproben untersucht, die im Rahmen von Leberresektionen und -explantationen in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg gewonnen worden waren. Die Gewebeproben wurden anhand der Diagnosen, die im histopathologischen Bericht gestellt wurden, in vier Gruppen eingeteilt (Tab.10):

Tabelle 10: Einteilung der Gewebeproben nach histopathologischem Befund

<b>Histopathologischer Befund</b>	<b>n</b>
Normalgewebe	11
Fibrose	27
Fibrotisch-zirrhotisches Gewebe	22
Zirrhose	60
HCC-umgebende Zirrhose	53
$\Sigma$	173

Die Normalgewebe als Kontrollgruppe zeigten keine histopathologischen Auffälligkeiten (Entzündungsinfiltrate, Nekrosen, Verfettung, Fibrosierung) und entstammten in der Regel dem Sicherheitsrand von Lebermetastasen, die operativ entfernt wurden. Die fibrotischen Gewebe umfassen Lebergewebe mit teilweiser Septenbildung bis hin zu ausgeprägter Fibrosierung.

Eine Zwischenstufe bildeten fibrotisch-zirrhotische Gewebe, die durch den Pathologen nicht eindeutig als reine Fibrose bzw. reine Zirrhose definiert wurden, da sie Merkmale beider Stadien aufweisen. Gewebe, die im Pathologie-Bericht als „zirrhotisches Gewebe“ oder Gewebe mit „komplettem zirrhotischem Umbau“ diagnostiziert wurden, sind unter dem Begriff Zirrhosen zusammengefasst. Von den reinen Zirrhosen wurden zirrhotische Gewebe abgegrenzt, die Lebern mit hepatozellulärem Karzinom entstammten (HCC-umgebende Zirrhosen).

## 3.2 IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression

### 3.2.1 Deskriptive Auswertung der mRNA Expression von IL-15 und Snail

Zunächst wurde die Häufigkeitsverteilung der IL-15 und Snail mRNA Expression erstellt und die erhobenen Werte hinsichtlich Mittelwert, Median, Minimum und Maximum analysiert (Abb.10 und 11). In den dargestellten Grafiken der vorliegenden Arbeit beschreibt die Snail bzw. IL-15 mRNA Expression der x-Achse jeweils die relative Expression im Vergleich zum quantifizierten Housekeeping-Gen PPIA (Peptidylprolylisomerase A).

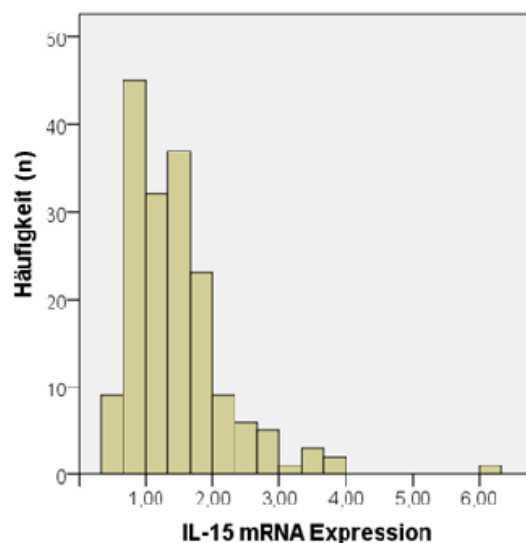


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der IL-15 mRNA Expression im untersuchten Probenkollektiv. n=173; Mittelwert: 1,44; Median: 1,34; Minimum: 0,38; Maximum: 6,17.

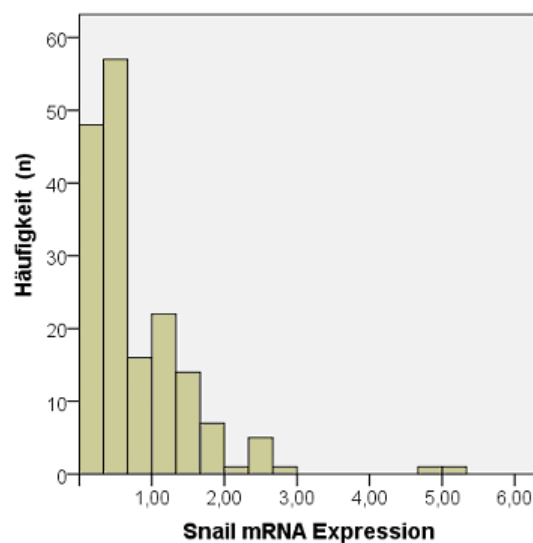


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der Snail mRNA Expression im untersuchten Probenkollektiv. n=173; Mittelwert: 0,78; Median: 0,54; Minimum: 0,03; Maximum: 5,17.

Für die Analysen mittels Chi-Quadrat-Test war eine Klassierung der Werte der mRNA Expression notwendig. Als Grenzwerte für die zwei Gruppen „hohes“ bzw. „niedriges“ IL-15 bzw. Snail wurden die jeweils aufgerundeten Mittelwerte der jeweiligen mRNA Expression, d.h. für IL-15 mRNA 1,5 (Mittelwert 1,44) und für Snail mRNA 1 (Mittelwert 0,78), gewählt.

### 3.2.2 Fragestellung 1: Zusammenhang zwischen der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA und der Fibroseprogression in humanen Lebergeweben

Es sollte zunächst überprüft werden, ob eine Korrelation der IL-15 mRNA Expression mit der zunehmenden Fibrosierung in der Leber besteht. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

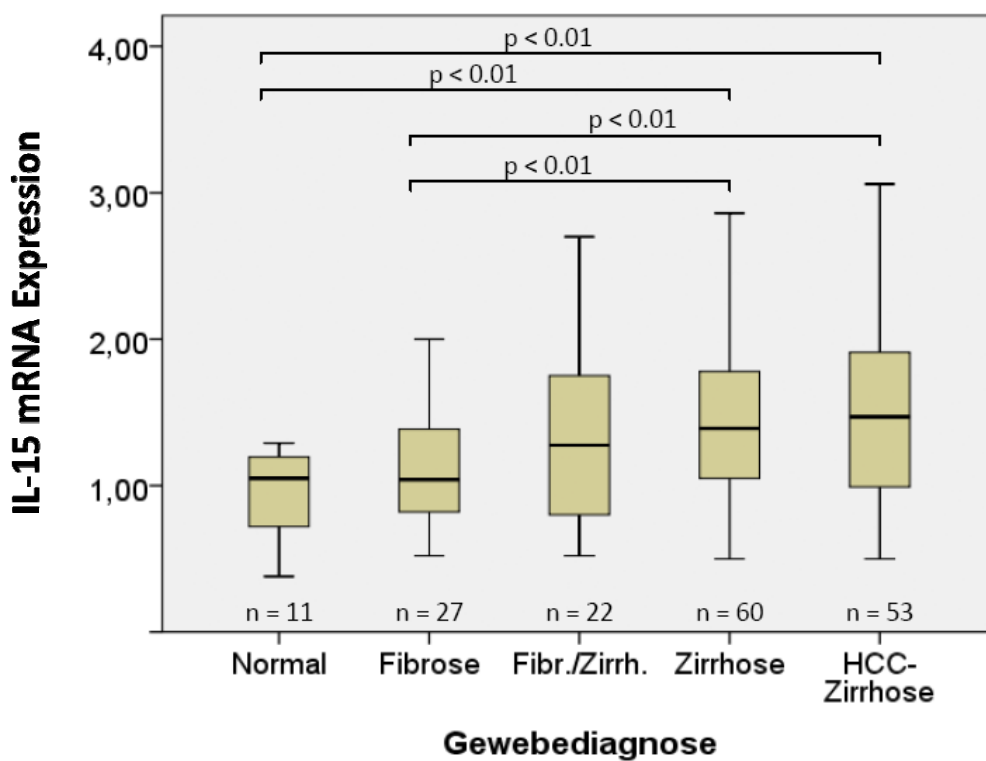


Abbildung 12: IL-15 mRNA Expression im humanen Lebergewebe. Die Lebergewebeproben sind nach zunehmender Fibrosierung bis hin zur Leberzirrhose gruppiert. Normal = Normalgewebe; Fibr./ Zirrh. = fibrotisch-zirrhosisches Gewebe; HCC-Zirrhose = HCC-umgebendes zirrhosisches Gewebe.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb.12 dargestellt: Es zeigt sich ein klarer Anstieg der Expression der IL-15 mRNA vom Normalgewebe über die Fibrose und Zirrhose zur HCC-

umgebenden Zirrhose. Signifikante Unterschiede finden sich zwischen Normalgewebe und Zirrhose, Normalgewebe und HCC-Zirrhose, Fibrose und Zirrhose, sowie Fibrose und HCC-umgebendem Gewebe. Obwohl sich in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied der IL-15 mRNA Expression zwischen reinen Zirrhosen und HCC-umgebenden zirrhotischen Geweben nachweisen lässt, zeigt sich in Abb.12 eine tendenziell erhöhte IL-15 mRNA Expression in HCC-umgeben Zirrhosen gegenüber reinen Zirrhosen. Eine Zunahme der Fibrosierung in der Leber geht folglich mit einer Erhöhung der Expression an IL-15 mRNA einher.

Die Analyse der Snail mRNA Expression hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit der Fibroseprogression in der Leber ergab folgendes Ergebnis:

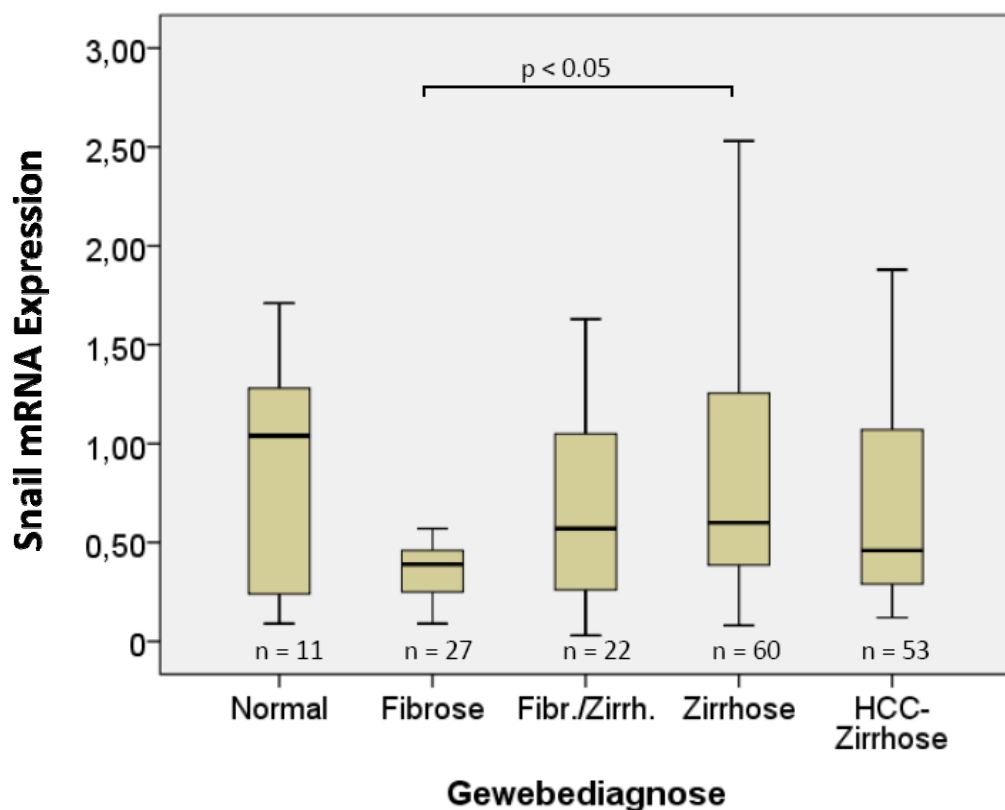


Abbildung 13: Snail mRNA Expression im humanen Lebergewebe. Die Lebergewebeproben sind nach steigender Fibrosierung gruppiert. Normal = Normalgewebe; Fibr./Zirrh. = fibrotisch-zirrhotisches Gewebe; HCC-Zirrhose = HCC-umgebendes zirrhotisches Gewebe.

Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Es zeigte sich keine Korrelation hinsichtlich der Snail mRNA Expression und der Fibroseprogression (Abb.13). Die Snail mRNA Expression ist bei Leberzirrhosen signifikant erhöht im Vergleich zu Leberfibrosen.

### 3.2.3 Fragestellung 2: Bedeutung der Ätiologie der humanen Leberfibrose/-zirrhose für die Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA

Den zirrhotischen Geweben lagen folgende Ätiologien zugrunde:

Tabelle 11: Ätiologie der zirrhotischen Lebergewebe

Ätiologie der Zirrhose	n
Alkoholtoxisch	28
Viral	25
Primär biliäre Zirrhose (PBC)	4
Autoimmunhepatitis (AI)	4
Hämochromatose	5
Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)	2
Overlap-Syndrom (AI + PSC)	2
Sekundär sklerosierende Cholangitis (SSC)	1
Budd-Chiari-Syndrom	1
Morbus Wilson	1
Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)	1
Kryptogen	39
$\Sigma$	113

Die zirrhotischen Gewebe in Tab.11 umfassen alle zirrhotisch veränderten sowie alle HCC-umgebenden zirrhotischen Gewebe. Unter den kryptogenen Zirrhosen wurden die Gewebe zusammengefasst, die in den erfassten Patientendaten als „kryptogene Leberzirrhosen“ beschrieben worden waren sowie alle Zirrhosen, bei denen keine eindeutige Ätiologie beschrieben worden war. Für die Analyse wurden aufgrund der geringen Fallzahlen in einigen Kategorien Ätiologien zusammengefasst, beispielsweise die immunologisch verursachten Zirrhosen PBC, PSC, SSC und AI. Ätiologien, die keiner sinnvollen Übergruppe zugeordnet werden konnten, wurden aufgrund der zu geringen Fallzahl und damit zu erwartender statistisch nicht relevanter Ergebnisse nicht in die Analyse mit eingeschlossen. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

Die IL-15 mRNA Expression der Leberzirrhosen ist signifikant erhöht gegenüber der Normalgewebe (Abb.14). Innerhalb der unterschiedlichen Ätiologien zeigten sich jedoch keine Unterschiede. Die Ätiologie der Leberzirrhose scheint keinen Einfluss auf die IL-15 mRNA Expression zu haben.

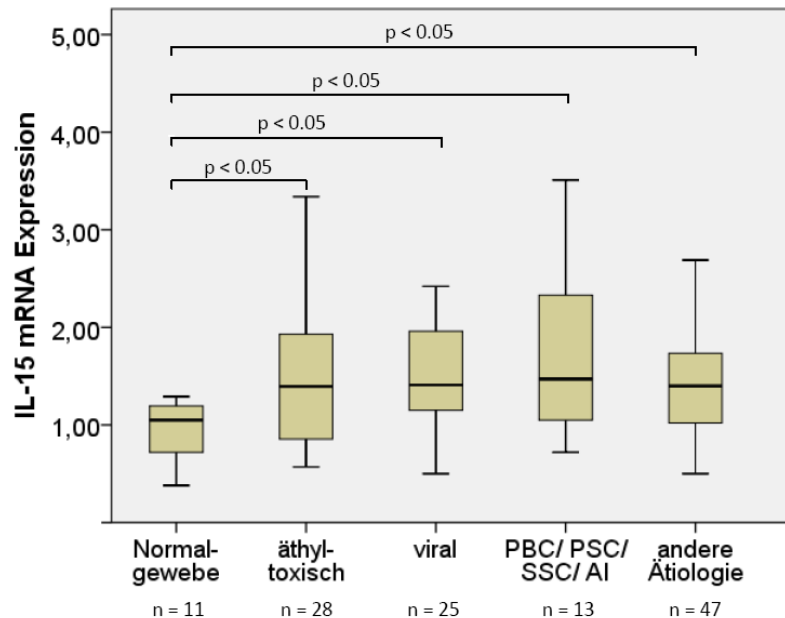


Abbildung 14: Expression von IL-15 mRNA in Leberzirrhosen unterschiedlicher Ätiologie. PBC = Primär biliäre Zirrhose; PSC = Primär sklerosierende Cholangitis; SSC = Sekundär sklerosierende Cholangitis; AI = Autoimmunhepatitis.

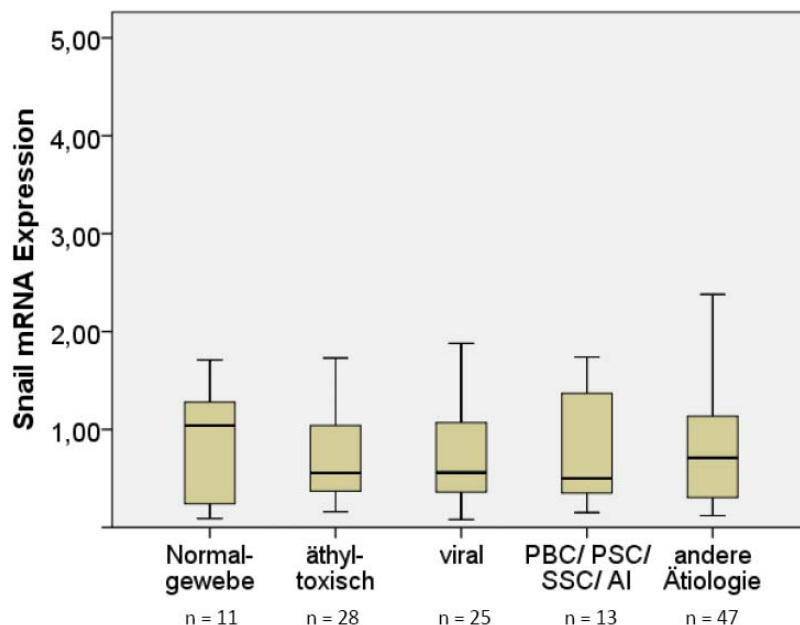


Abbildung 15: Expression von Snail mRNA in Leberzirrhosen unterschiedlicher Ätiologie. PBC = Primär biliäre Zirrhose; PSC = Primär sklerosierende Cholangitis; SSC = Sekundär sklerosierende Cholangitis; AI = Autoimmunhepatitis.

Die Untersuchung der Expression von Snail mRNA zeigte weder eine unterschiedliche Expression bei Leberzirrhosen im Vergleich zu Normalgeweben, noch signifikante Unterschiede innerhalb der Ätiologien der Leberzirrhose (Abb.15). Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

Es ist bekannt, dass innerhalb der Virushepatitiden Hepatitis B deutlich infektiöser ist als Hepatitis C – beispielsweise beträgt das Infektionsrisiko bei Nadelstichverletzung für Hepatitis B 30%, für Hepatitis C nur 1,5-3% (Sarrazin, 2005). Dennoch haben Träger des Hepatitis C-Virus eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit (mindestens 20% innerhalb von 20 Jahren) für eine Chronifizierung ihrer Erkrankung (Seeff, 2002). Diese Chronifizierung geht mit der Ausbildung einer Leberzirrhose einher (But, 2008). Aufgrund der unterschiedlichen Prognose einer Infektion mit Hepatitis B und C wurden die Hepatitis-positiven Leberzirrhosen im Folgenden hinsichtlich ihrer Korrelation mit der Expression von IL-15 und Snail mRNA untersucht (Abb.16). In diese Untersuchung wurden die rein zirrhotischen Gewebe sowie die HCC-umgebenden Gewebe eingeschlossen. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Es zeigte sich, dass die IL-15 mRNA Expression in Geweben mit Hepatitis C signifikant erhöht ist gegenüber Geweben von Patienten mit positiver Hepatitis-B-Serologie.

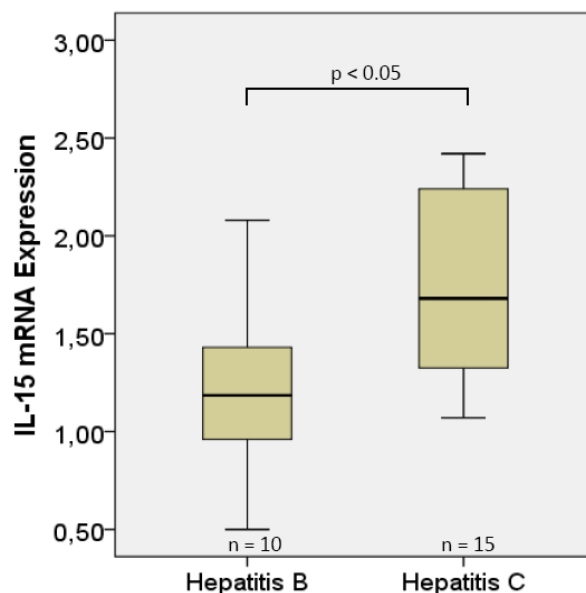


Abbildung 16: Korrelation der Hepatitis-Serologie mit der IL-15 mRNA Expression.



Dieselbe Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test für die Snail mRNA Expression ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Hepatitis B- und Hepatitis C-bedingten Leberzirrhose ( $p=0,461$ ).

### **3.2.4 Fragestellung 3: Korrelationen zwischen IL-15 und Snail mRNA Expression und patientenbezogenen Daten**

#### **3.2.4.1 Child-Turcotte-Pugh- und MELD-Score**

CTP- und MELD-Score dienen der prognostischen Einschätzung der Leberzirrhose. In beiden Scores sind laborchemische, im CTP-Score auch klinische Parameter enthalten, die eine klinische Beurteilung des von der Leberzirrhose betroffenen Patienten ermöglichen sollen. Da die IL-15 mRNA Expression mit zunehmender Fibrosierung ansteigt (s.Abb.14), stellt sich die Frage, inwieweit IL-15 mRNA Expression mit den Scores, also mit dem klinisch eingeschätzten Schweregrad der Leberzirrhose, in Verbindung steht. Da CTP- und MELD-Score ihre Anwendung bei Leberzirrhosen finden, wurden in die Analyse nur die Gewebe eingeschlossen, die einen deutlichen zirrhotischen Umbau zeigten (reine zirrhotische Gewebe und HCC-umgebende zirrhotische Gewebe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p<0,05$ . Von den insgesamt im Rahmen der Arbeit untersuchten zirrhotischen und HCC-umgebenden zirrhotischen Geweben ( $n=113$ ) wurde nur bei 78 Geweben der Child-Score durch den behandelnden Arzt erhoben. Zur Berechnung der MELD-Scores der Patienten fehlten bei 22 Patienten die erforderlichen Parameter (INR, Bilirubin gesamt, Kreatinin im Serum), sodass letztendlich bei 91 Patienten mit Leberzirrhose der MELD-Score erhoben werden konnte. Weder CTP-, noch MELD-Score korrelieren mit der Expression von IL-15 mRNA (Tab.12). Signifikante Korrelationen zeigen sich dagegen zwischen der Snail mRNA Expression und CTP- und MELD-Score (Tab.13): Ein hoher CTP- bzw. MELD-Score ist mit einer erhöhten Snail mRNA Expression assoziiert.

Tabelle 12: Korrelation des CTP- und MELD-Score mit der IL-15 mRNA Expression.

	n gesamt (%)	IL-15 $\leq 1,5$ n (%)	IL-15 $> 1,5$ n (%)	p
CTP-Score	78			0,235
Child A	29 (37)	15 (52)	14 (48)	
Child B	17 (22)	7 (41)	10 (59)	
Child C	32 (41)	21 (66)	11 (34)	
MELD-Score	91			0,724
6-10	38 (42)	24 (63)	14 (37)	
11-20	33 (36)	19 (58)	14 (42)	
21-30	14 (15)	6 (43)	8 (57)	
31-40	6 (7)	5 (83)	1 (17)	

Tabelle 13: Korrelation des CTP- und MELD-Score mit der Snail mRNA Expression.

	n gesamt (%)	Snail $\leq 1$ n (%)	Snail $> 1$ n (%)	p
CTP-Score	78			<b>0,004</b>
Child A	29 (37)	26 (90)	3 (10)	
Child B	17 (22)	14 (82)	3 (18)	
Child C	32 (41)	17 (53)	15 (47)	
MELD-Score	91			<b>0,014</b>
6-10	38 (42)	30 (79)	8 (21)	
11-20	33 (36)	24 (73)	9 (27)	
21-30	14 (15)	8 (57)	6 (43)	
31-40	6 (7)	1 (17)	5 (83)	

### 3.2.4.2 Klinische Parameter

Die Inzidenz vieler Erkrankungen zeigt eine alters- und geschlechtsspezifische Häufung. Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas, Diabetes, Hypercholesterinämie und Hypertonus greifen weitreichend in den Organismus ein, nicht zuletzt auch in den Leberstoffwechsel, und können so mit der Entwicklung von Lebererkrankungen bis zur hin Leberzirrhose in Verbindung stehen. Als Beispiel sei hier die NASH (Nichtalkoholische Steatohepatitis) anzuführen, die mit dem Metabolischen Syndrom und Diabetes assoziiert ist (Farrell, 2006). Im Folgenden wurden daher klinische Merkmale der Patienten hinsichtlich einer potentiellen Korrelation mit der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA analysiert. Diabetes, Hypercholesterinämie und Hypertonus galten als vorhanden, wenn dies in den Patientenunterlagen entsprechend vermerkt worden war. Zu den an Adipositas leidenden Patienten wurden diejenigen Patienten gezählt, deren Body Mass Index (BMI) mindestens 30 beträgt. Der BMI wurde mithilfe der dokumentierten Größen- und Gewichtsdaten der Patienten berechnet ( $\text{BMI} = \text{Körpergewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]}^2)$ ). Bei 14 Patienten waren Körpergröße und -gewicht nicht dokumentiert, sodass sich bei diesen kein BMI berechnen ließ. In die Analyse wurden die Gewebeproben aller untersuchten Patientenproben, unabhängig von ihrer Gewebediagnose, miteinbezogen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Es lässt sich keine Korrelation zwischen klinischen Merkmalen der Patienten und der Expression an IL-15 mRNA und Snail mRNA nachweisen (Tab.14 und Tab.15). Die IL-15 mRNA Expression korreliert jedoch signifikant mit einer Hypercholesterinämie, d.h. pathologisch erhöhtes Cholesterin im Serum geht mit einer erhöhten Expression an IL-15 mRNA einher.

Tabelle 14: Korrelation der klinischen Merkmale mit der IL-15 mRNA Expression

	n gesamt (%)	IL-15 $\leq$ 1,5 n (%)	IL-15 > 1,5 n (%)	p
Alter	173			
$\leq$ 65 Jahre	114 (66)	72 (63)	42 (37)	0,545
> 65 Jahre	59 (34)	40 (68)	19 (32)	
Geschlecht	173			
männlich	125 (72)	83 (66)	42 (34)	0,481
weiblich	48 (28)	29 (60)	19 (40)	
Adipositas	159			
nein	130 (82)	86 (66)	44 (34)	0,771
ja	29 (18)	20 (69)	9 (31)	
Diabetes	173			
nein	115 (66)	74 (64)	41 (36)	0,879
ja	58 (34)	38 (66)	20 (34)	
Hypercholesterinämie	173			
nein	160 (92)	108 (68)	52 (32)	<b>0,008</b>
ja	13 (8)	4 (31)	9 (69)	
Hypertonus	173			
nein	104 (60)	69 (66)	35 (34)	0,587
ja	69 (40)	43 (62)	26 (38)	

Tabelle 15: Korrelation der klinischen Merkmale mit der Snail mRNA Expression

	n gesamt (%)	Snail $\leq 1$ n (%)	Snail $> 1$ n (%)	p
Alter	173			
$\leq 65$ Jahre	114 (66)	76 (67)	38 (33)	0,122
$> 65$ Jahre	59 (34)	46 (78)	13 (22)	
Geschlecht	173			
männlich	125 (72)	86 (69)	39 (31)	0,423
weiblich	48 (28)	36 (75)	12 (25)	
Adipositas	159			
nein	130 (82)	91 (70)	39 (30)	0,913
ja	29 (18)	20 (69)	9 (31)	
Diabetes	173			
nein	115 (67)	79 (69)	36 (31)	0,459
ja	58 (33)	43 (74)	15 (26)	
Hypercholesterinämie	173			
nein	160 (92)	113 (71)	47 (29)	0,916
ja	13 (8)	9 (69)	4 (31)	
Hypertonus	173			
nein	104 (60)	71 (68)	33 (32)	0,425
ja	69 (40)	51 (74)	18 (26)	

Eine Analyse des Zusammenhangs des Geschlechts der Patienten mit Leberzirrhose (rein zirrhotische Gewebe und HCC-umgebende zirrhotische Gewebe) mit der IL-15 bzw. Snail mRNA Expression ergab folgendes Ergebnis:

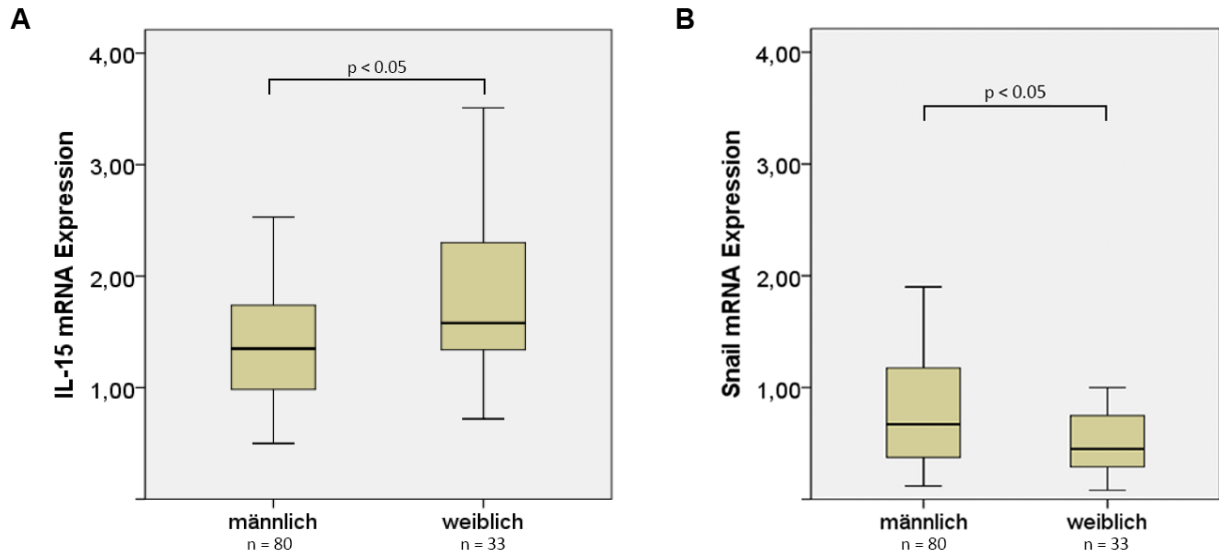


Abbildung 17: Korrelation des Geschlechts der Patienten mit Leberzirrhose mit der IL-15 mRNA (A) bzw. Snail mRNA Expression (B). In die Analyse wurden nur Gewebe mit deutlichem zirrhotischen Umbau eingeschlossen.

Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Frauen, die an Leberzirrhose leiden, weisen eine signifikant erhöhte IL-15 mRNA Expression gegenüber männlichen Patienten mit Leberzirrhose auf (Abb.17A). Dagegen zeigen Männer mit Leberzirrhose eine signifikant erhöhte Expression an Snail mRNA gegenüber Frauen mit zirrhotischen Lebern (Abb.17B). Die Analyse der Normalgewebe und fibrotischen Lebergewebe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied der IL-15 und Snail mRNA Expression bezüglich des Geschlechts der Patienten (Daten nicht dargestellt).

### 3.2.4.3 Genussmittelkonsum

Der Konsum von Genussmitteln spielt eine wichtige Rolle bei Entstehung und Verlauf vieler Erkrankungen. Insbesondere bei der Leberzirrhose ist ein Großteil alkoholtoxisch verursacht (Kap.1.1.2). Daher wurde untersucht, ob sich bei Patienten, die Genussmittel konsumieren, ein Anstieg von IL-15 mRNA oder Snail mRNA Expression im Lebergewebe nachweisen lässt (Tab.16 und Tab.17).

Tabelle 16: Korrelation des Nikotinkonsums der Patienten mit der IL-15 mRNA Expression

	n gesamt (%)	IL-15 $\leq 1,5$ n (%)	IL-15 $> 1,5$ n (%)	p
gesamt	145			
Nichtraucher	98 (68)	63 (64)	35 (36)	0,480
(Ex-)Raucher	47 (32)	33 (70)	14 (30)	

Tabelle 17: Korrelation des Nikotinkonsums der Patienten mit der Snail mRNA Expression

	n gesamt (%)	Snail $\leq 1$ n (%)	Snail $> 1$ n (%)	p
gesamt	145			
Nichtraucher	98 (68)	69 (70)	29 (30)	0,981
(Ex-)Raucher	47 (32)	33 (70)	14 (30)	

Die Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . In die Analyse wurden alle Gewebe von Patienten, bei denen eine positive oder negative Rauchanamnese erhoben wurde, miteinbezogen. Es fanden sich keine Korrelationen, d.h. weder IL-15 mRNA noch Snail mRNA zeigen in ihrer Expression einen Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum der Patienten. Auch eine separate Untersuchung der gruppierten Gewebe (Normalgewebe; Fibrose; Fibrose-Zirrhose/ Zirrhose/ HCC-umgebende Zirrhose) ergab keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht dargestellt).

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum der Patienten und Expression von IL-15 und Snail mRNA untersucht. Die Einteilung der untersuchten Proben in die jeweilige Gruppe (kein Alkohol, gelegentlicher Konsum, Abusus, Zustand nach Abusus) erfolgte mithilfe der Angaben in den Anamnesebögen der Chirurgen und Anästhesisten. Als gelegentlicher Alkoholkonsum wird ein Konsum von 20g reinem Alkohol pro Tag für Frauen und 40g für Männer verstanden, entsprechend der Definition eines „risikoarmen Konsums“ nach der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA, 2001). 20g reiner Alkohol entsprechen etwa einem halben Liter Bier oder einem Glas Wein (200ml) (Schmidt, 1997). In die Gruppe der Patienten mit „Abusus“ werden die Patienten gerechnet, deren Alkoholkonsum die Grenzen des gelegentlichen Konsums überschreitet (d.h. ♀:  $> 20\text{g/Tag}$ ; ♂:  $> 40\text{g/Tag}$ ). Die „Zustand nach (Z.n.) Abusus“-Gruppe enthält Patienten, die nach einem Abusus aktuell alkoholabstinent waren. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (Abb. 18 und 19).

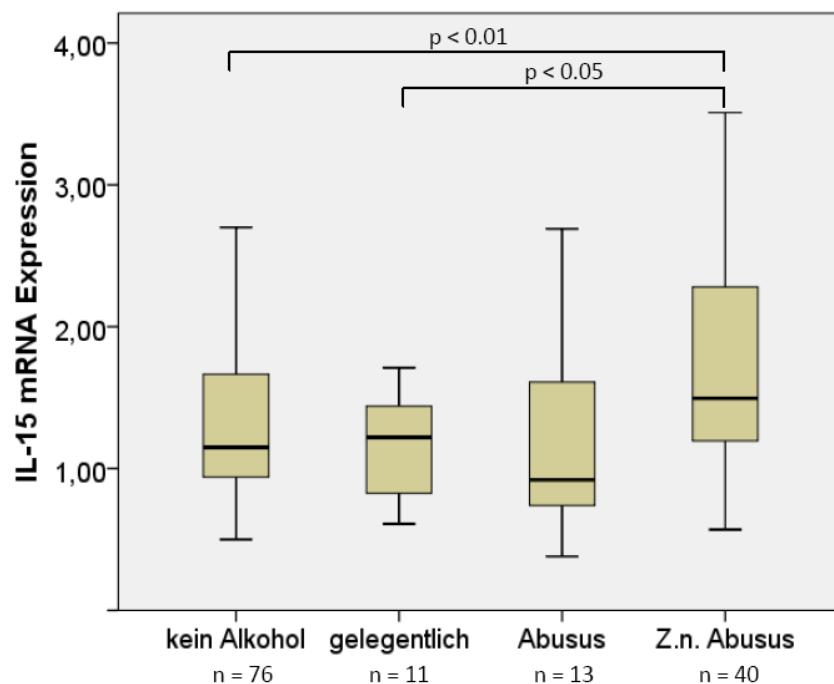


Abbildung 18: Korrelation des Alkoholkonsums der untersuchten Patienten (n=140) mit der IL-15 mRNA Expression.

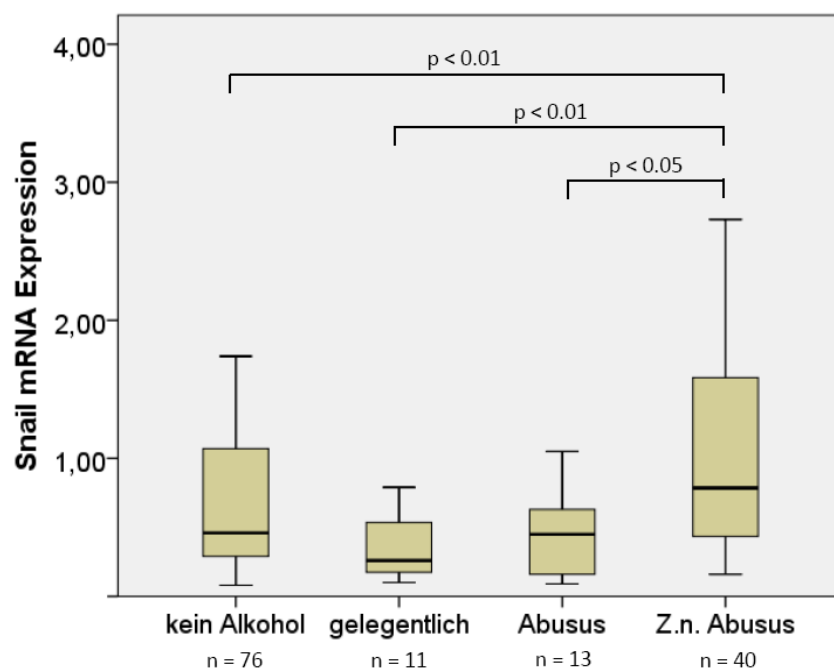


Abbildung 19: Korrelation des Alkoholkonsums der untersuchten Patienten (n=140) mit der Snail mRNA Expression.



Die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Alkoholkonsum der Patienten und Expression an IL-15 mRNA und Snail mRNA ergab jeweils eine hohe Expression dieser beider Faktoren bei Patienten, die einen Alkoholkonsum in der Vorgeschichte angegeben hatten. Die IL-15 mRNA Expression im Lebergewebe war bei Patienten mit einem Alkoholabusus in der Vorgeschichte deutlich erhöht gegenüber Lebergeweben von Patienten, die gar keinen oder nur gelegentlich Alkohol konsumierten. Für Patienten mit aktivem Abusus ließ sich kein signifikanter Unterschied gegenüber den anderen untersuchten Gruppen nachweisen. Patienten mit Z.n. Abusus wiesen eine tendenziell, jedoch nicht signifikant ( $p=0,052$ ) erhöhte IL-15 mRNA Expression auf im Vergleich zu Patienten mit aktivem Alkoholabusus. Kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen Patienten ohne Alkoholkonsum, Patienten mit gelegentlichem Konsum und Patienten mit aktivem Abusus (Abb.18). Bezüglich der Expression von Snail mRNA resultierte eine signifikant erhöhte Expression bei Patienten mit Alkoholabusus in der Vorgeschichte gegenüber Patienten, die keinen oder gelegentlich Alkohol konsumierten, sowie gegenüber aktiven Alkoholikern. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen Patienten ohne Alkoholkonsum, solchen mit gelegentlichem Alkoholkonsum und Patienten mit einem aktiven Abusus nachgewiesen werden (Abb.19). Zu beachten ist, dass die Aussagekraft einer vergleichenden Statistik in den Gruppen der Patienten mit gelegentlichem Alkoholkonsum und aktivem Abusus durch die geringe Gruppengröße beeinträchtigt wird.

#### 3.2.4.4 Laborchemische Parameter

Im Rahmen der Patientendatenerhebung wurden Laborparameter akquiriert, die im Rahmen der Leberzirrhose-Diagnostik eine Rolle spielen. Eine Erhöhung bzw. Erniedrigung dieser Parameter geht mit bestimmten biochemischen Prozessen einher. So weist eine erhöhte GPT beispielsweise auf eine Leberzellschädigung hin, während eine verminderte CHE eine verminderte Syntheseleistung der Leber anzeigt. Eine Korrelation mit einem dieser Parameter könnte daher richtungsweisend bezüglich der Funktion von IL-15 oder Snail im Rahmen der biochemischen Vorgänge in der Leber sein. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p<0,05$ . In die Analyse wurden alle Gewebeproben miteinbezogen. Die Gesamtzahlen der untersuchten Proben schwanken je nach Laborparameter ( $n_{\text{gesamt}} = 173$ ), da die Laborparameter nicht nach einem einheitlichen Schema erfasst worden waren. Eine hohe IL-15 mRNA Expression korreliert signifikant mit einer erhöhten Konzentration der GOT und des AFP (Tab.18). Die übrigen Analysen ergaben keine Korrelationen zwischen IL-15 mRNA oder Snail mRNA Expression und den laborchemischen Parametern (Tab. 18 und 19). Auch eine separate

Untersuchung der verschiedenen Gewebediagnosen (Normalgewebe/ Fibrose/ Fibrose-Zirrhose/ Zirrhose/ HCC-umgebende Zirrhose) ergab keine signifikanten Korrelationen.

Tabelle 18: Korrelation laborchemischer Parameter mit der IL-15 mRNA Expression\*

	n gesamt (%)	IL-15 $\leq$ 1,5 n (%)	IL-15 > 1,5 n (%)	p
Alkalische Phosphatase	169			
$\leq$ 136 U/l	92 (54)	59 (64)	33 (36)	0,913
> 136 U/l	77 (46)	50 (65)	27 (35)	
Bilirubin (gesamt)	169			
$\leq$ 1 mg/dl	74 (44)	48 (65)	26 (35)	0,930
> 1 mg/dl	95 (56)	61 (64)	34 (36)	
GOT	166			
$\leq$ 35 U/l	34 (21)	27 (79)	7 (21)	<b>0,041</b>
> 35 U/l	132 (79)	80 (61)	52 (39)	
GPT	155			
$\leq$ 35 U/l	57 (37)	39 (68)	18 (32)	0,438
> 35 U/l	98 (63)	61 (62)	37 (38)	
GGT	149			
$\leq$ 40 U/l	18 (12)	13 (72)	5 (28)	0,360
> 40 U/l	131 (88)	80 (61)	51 (39)	
Quick	171			
$\leq$ 70%	52 (30)	33 (64)	19 (36)	0,793
> 70%	119 (70)	78 (66)	41 (34)	
PTT	169			
$\leq$ 36,6 s	101 (60)	65 (64)	36 (36)	0,963
> 36,6 s	68 (40)	44 (65)	24 (35)	
CHE	146			
$\leq$ 7000 U/l	109 (75)	65 (60)	44 (40)	0,080
> 7000 U/l	37 (25)	28 (76)	9 (24)	
AFP	90			
$\leq$ 8,1 ng/ml	53 (59)	37 (70)	16 (30)	<b>0,023</b>
> 8,1 ng/ml	37 (41)	17 (46)	20 (54)	

Tabelle 19: Korrelation laborchemischer Parameter mit der Snail mRNA Expression\*

	n gesamt (%)	Snail ≤ 1 n (%)	Snail > 1 n (%)	p
Alkalische Phosphatase	169			
≤ 136 U/l	92 (54)	63 (69)	29 (31)	0,326
> 136 U/l	77 (46)	58 (75)	19 (25)	
Bilirubin (gesamt)	169			
≤ 1 mg/dl	74 (44)	57 (77)	17 (23)	0,167
> 1 mg/dl	95 (56)	64 (67)	31 (33)	
GOT	166			
≤ 35 U/l	34 (21)	28 (82)	6 (18)	0,141
> 35 U/l	132 (79)	92 (70)	40 (30)	
GPT	155			
≤ 35 U/l	57 (37)	40 (70)	17 (30)	0,976
> 35 U/l	98 (63)	69 (70)	29 (30)	
GGT	149			
≤ 40 U/l	18 (12)	12 (67)	6 (33)	0,508
> 40 U/l	131 (88)	97 (74)	34 (26)	
Quick	171			
≤ 70%	52 (30)	32 (62)	20 (38)	0,080
> 70%	119 (70)	89 (75)	30 (25)	
PTT	169			
≤ 36,6 s	101 (60)	73 (72)	28 (28)	0,657
> 36,6 s	68 (40)	47 (69)	21 (31)	
CHE	146			
≤ 7000 U/l	109 (75)	73 (67)	36 (33)	0,051
> 7000 U/l	37 (25)	31 (84)	6 (16)	
AFP	90			
≤ 8,1 ng/ml	53 (59)	40 (75)	13 (25)	0,275
> 8,1 ng/ml	37 (41)	24 (65)	13 (35)	

\*Grenzwerte gemäß den Vorgaben des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg, Stand 09/13.

### 3.2.4.5 Histopathologische Veränderungen

Mithilfe des Pathologieberichts konnte neben dem Ausmaß der Fibrogenese bzw. Zirrhose auch eine weitere Charakterisierung der Lebergewebe erfolgen. Der Fokus wurde hierbei auf das Vorhandensein von Entzündungsinfiltraten und Verfettung sowie Cholestase und Nekrose gelegt. Entsprechende Korrelationen könnten Hinweise auf die Lokalisation von IL-15 und Snail mRNA geben. Insbesondere interessierte, ob vorhandene Entzündungsinfiltrate mit erhöhter IL-15 mRNA Expression korrelieren, da bisher nicht eindeutig geklärt ist, welche Zellen in der Leber IL-15 exprimieren. In die Untersuchung wurden alle Gewebe mit einbezogen, die fibrogenetische Veränderungen aufwiesen, d.h. fibrotische, zirrhotische Gewebe sowie HCC-umgebende Zirrhosen. Die Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (Tab.20 und 21).

Tabelle 20: Korrelation der histopathologischen Veränderungen mit der IL-15 mRNA Expression

	n gesamt (%)	IL-15 $\leq 1,5$ n (%)	IL-15 $> 1,5$ n (%)	p
Entzündungsinfiltrate	162			
nein	43 (27)	25 (58)	18 (42)	0,445
ja	119 (73)	77 (65)	42 (35)	
Verfettung	162			
nein	104 (64)	64 (62)	40 (38)	0,615
ja	58 (36)	38 (66)	20 (34)	
Cholestase	162			
nein	105 (65)	59 (56)	46 (44)	<b>0,015</b>
ja	57 (35)	43 (75)	14 (25)	
Nekrosen	162			
nein	141 (87)	85 (60)	56 (40)	0,067
ja	21 (13)	17 (81)	4 (19)	

Tabelle 21: Korrelation der histopathologischen Veränderungen mit der Snail mRNA Expression

	n gesamt (%)	Snail $\leq 1$ n (%)	Snail $> 1$ n (%)	p
Entzündungsinfiltrate	162			
nein	43 (27)	33 (77)	10 (23)	0,440
ja	119 (73)	84 (71)	35 (29)	
Verfettung	162			
nein	104 (64)	75 (72)	29 (28)	0,968
ja	58 (36)	42 (72)	16 (28)	
Cholestase	162			
nein	105 (65)	77 (73)	28 (27)	0,668
ja	57 (35)	40 (70)	17 (30)	
Nekrosen	162			
nein	141 (87)	106 (75)	35 (25)	<b>0,030</b>
ja	21 (13)	11 (52)	10 (48)	

Die Analyse ergab, dass die IL-15 mRNA Expression keine Korrelation mit vorhandenen Entzündungsinfiltraten im fibrotischen und zirrhotischen Lebergewebe zeigte. Gleiches ergab sich für das Vorhandensein von Verfettung und Nekrosen. Interessanterweise zeigte sich jedoch ein inverser Zusammenhang zwischen IL-15 mRNA Expression und Cholestase. Gewebe, die keine Cholestase aufwiesen, zeigten eine signifikant höhere IL-15 mRNA Expression im Vergleich zu cholestatisch veränderten Lebergeweben. Für die Expression von Snail mRNA konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher Snail mRNA Expression und dem Vorhandensein von Nekrosen im Lebergewebe nachgewiesen werden. Für das Vorhandensein von Entzündungsinfiltraten, Verfettung und Cholestase und der Snail mRNA Expression zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

### 3.2.5 Fragestellung 4: Zusammenhang der Expressionslevel von IL-15 mRNA und Snail mRNA in humanen Lebergeweben mit der Überlebenszeit der Patienten

In der folgenden Analyse wurde das kumulative Überleben der Patienten nach einer Leberresektion im Zusammenhang mit der IL-15 bzw. Snail mRNA Expression des Lebergewebes untersucht. Patienten, die im Rahmen ihrer Operation eine Transplantleber

erhielten (n=16), wurden nicht in die Analyse miteinbezogen. Bei 49 Patienten konnten keine Daten hinsichtlich ihres Überlebens erfasst werden. Untersucht wurden zunächst alle Proben unabhängig von ihrer Gewebediagnose (n=108). Die Analyse erfolgte mittels Logrank-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Hierbei zeigte sich weder für die Expression von IL-15 mRNA ( $p=0,685$ ) noch für die Expression von Snail mRNA ( $p=0,456$ ) ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Patientenüberlebens (Daten nicht dargestellt). Im Folgenden wurden allein die Gewebe mit komplettem zirrhotischem Umbau inklusive der HCC-umgebenden Zirrhosen analysiert:

Tabelle 22: Auswertung der IL-15 mRNA Expression in der Leberzirrhose und Korrelation mit der Überlebenszeit nach Leberresektion im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren

mRNA Expression	n	Anzahl Todesfälle	Mittelwert Überlebenszeit in Jahren (95% Konfidenzintervall)
IL-15 $\leq 1,5$	23	13	2,665 (1,815 – 3,516)
IL-15 $> 1,5$	21	6	3,517 (2,641 – 4,394)

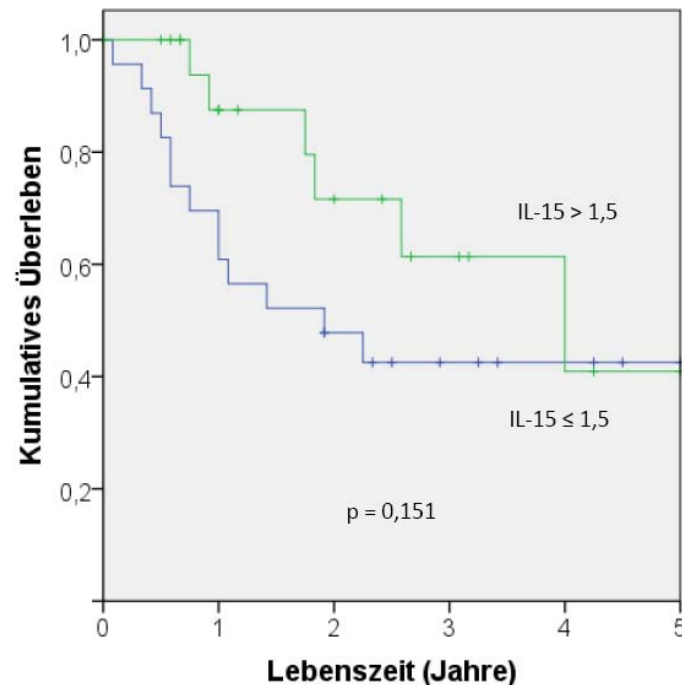


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben in Monaten nach Leberresektion bei Patienten mit Leberzirrhose in Abhängigkeit von der IL-15 mRNA Expression.

Tabelle 23: Auswertung der Snail mRNA Expression in der Leberzirrhose und Korrelation mit der Überlebenszeit nach Leberresektion im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren

mRNA Expression	n	Anzahl Todesfälle	Mittelwert Überlebenszeit in Jahren (95% Konfidenzintervall)
Snail $\leq 1$	32	13	3,184 (2,443 – 3,926)
Snail $> 1$	12	6	2,764 (1,654 – 3,874)

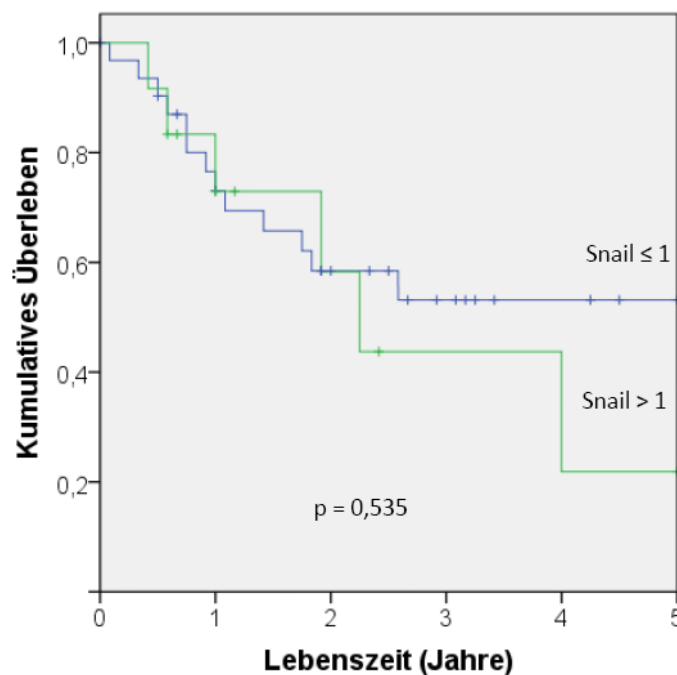


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben in Monaten nach Leberresektion bei Patienten mit Leberzirrhose in Abhängigkeit von der Snail mRNA Expression.

Weder eine hohe noch eine niedrige Expression an IL-15 mRNA oder Snail mRNA im zirrhotisch veränderten Lebergewebe hat einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten (Abb.20 und 21). In der Kaplan-Meier-Kurve zeigt sich, dass in den ersten drei Jahren nach Leberresektion deutlich mehr Patienten mit erhöhter IL-15 mRNA Expression überleben im Vergleich zu Patienten mit geringer IL-15 mRNA Expression. Im 4. postoperativen Jahr nähern sich die Kurven jedoch wieder aneinander an (Abb.20).

Da sich in der Analyse der Expression von IL-15 mRNA im Zusammenhang mit der Fibrosierung ein tendenzieller Anstieg der IL-15 mRNA Expression bei HCC-umgebenden Zirrhosen im Vergleich zu „reinen“ zirrhotischen Geweben darstellte (Abb.12), wurde im

Folgenden noch einmal gezielt die Gruppe der HCC-umgebenden Zirrhosen hinsichtlich ihrer Überlebensrate analysiert. Die Analyse erfolgte mittels Logrank-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

Tabelle 24: Auswertung der IL-15 mRNA Expression in peritumoralem zirrhotischen Lebergewebe von Patienten mit HCC und Korrelation mit der Überlebenszeit nach kurativer Leberresektion im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren

mRNA Expression	n	Anzahl Todesfälle	Mittelwert Überlebenszeit in Jahren (95% Konfidenzintervall)
IL-15 $\leq 1,5$	15	10	2,283 (1,275 – 3,292)
IL-15 $> 1,5$	19	7	3,229 (2,311 – 4,146)

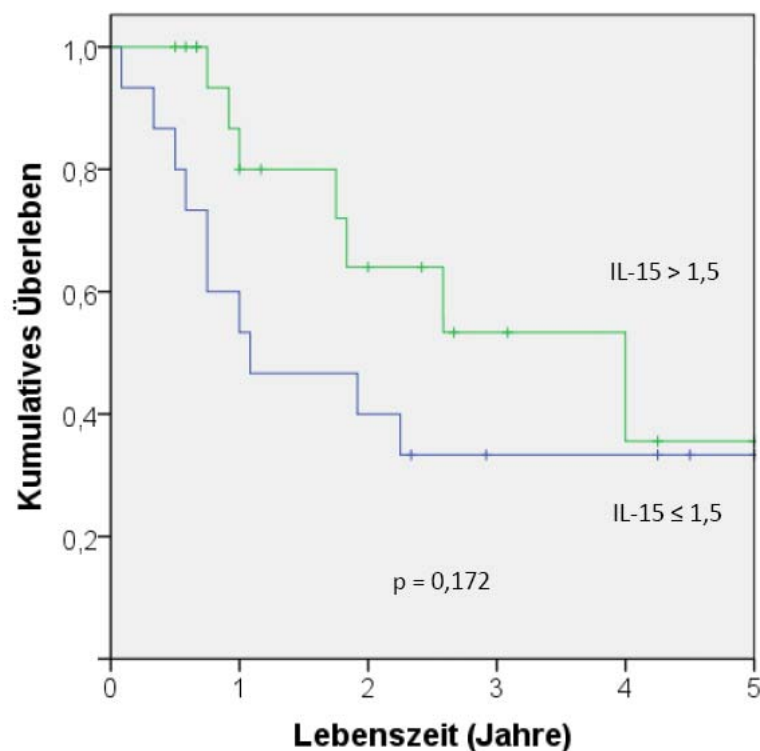


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben in Monaten nach kurativer Leberresektion eines HCC-Herdes bei Patienten mit HCC-umgebender Leberzirrhose in Abhängigkeit von der IL-15 mRNA Expression.

Die Untersuchung zeigte, dass eine erhöhte IL-15 mRNA Expression in zirrhotischem Gewebe, das ein HCC umgibt, nach kurativer Leberresektion nicht mit signifikant



verlängertem Überleben des Patienten korreliert (Abb.22). Analog zur Analyse aller zirrhotisch veränderten Gewebe (Abb.20) zeigt sich in den ersten postoperativen Jahren jedoch ein Trend von längerem Überleben bei Patienten mit hoher IL-15 mRNA Expression, die sich im 4. postoperativen Jahr jedoch der Kurve der Patienten mit niedriger IL-15 mRNA Expression angleicht.

Dieselbe Analyse für die Expression von Snail mRNA in peritumoralen zirrhotischen Geweben von Patienten mit HCC nach kurativer Leberresektion mittels Logrank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Überlebensraten der Patienten ( $p=0,603$ ) (Daten nicht dargestellt).

### 3.3 Lokalisation von IL-15 im Lebergewebe

Um die Lokalisation von IL-15 Protein im Lebergewebe zu determinieren, wurde bei 23 Lebergewebeproben eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-IL-15 Antikörper durchgeführt. Die ausgewählten Gewebeproben sind in Tab. 25 charakterisiert:

Tabelle 25: Charakterisierung der Gewebeschnitte für die immunhistochemische Färbung

<b>Fibrosierungsgrad</b>	<b>Ätiologie der Fibrose/ Zirrh.</b>	<b>n (Gewebeschnitte)</b>
Normalgewebe	-	4
Fibrose	Cholangiozelluläres Karzinom	2
Fibrose	Biliäre Obstruktion	1
Fibrose	Filiae (kolorektales Karzinom)	1
Zirrhose	Alkoholtoxisch	4
Zirrhose	Autoimmunhepatitis/ PSC	1
HCC-umgebende Zirrhose	Alkoholtoxisch	2
HCC-umgebende Zirrhose	Hepatitis B	2
HCC-umgebende Zirrhose	Hepatitis C	3
HCC-umgebende Zirrhose	Unbekannte Ätiologie	3
$\Sigma$		23

Zunächst wurde die Spezifität der Analyse überprüft, indem HCC-umgebendes zirrhotisches Lebergewebe mit einem isotypischen IgG-Antikörper (Vectastain® Elite® ABC Kit Ziegen-IgG PK-6100) inkubiert wurde. Die Auswertung der Negativkontrolle mit isotypischem IgG-Antikörper (Abb.23B) zeigte keine Hintergrundfärbung; im Gegensatz dazu konnte eine verstärkte Immunoreaktivität des anti-IL-15 Antikörpers bei zirrhotischem Gewebe nachgewiesen werden (Abb.23A).

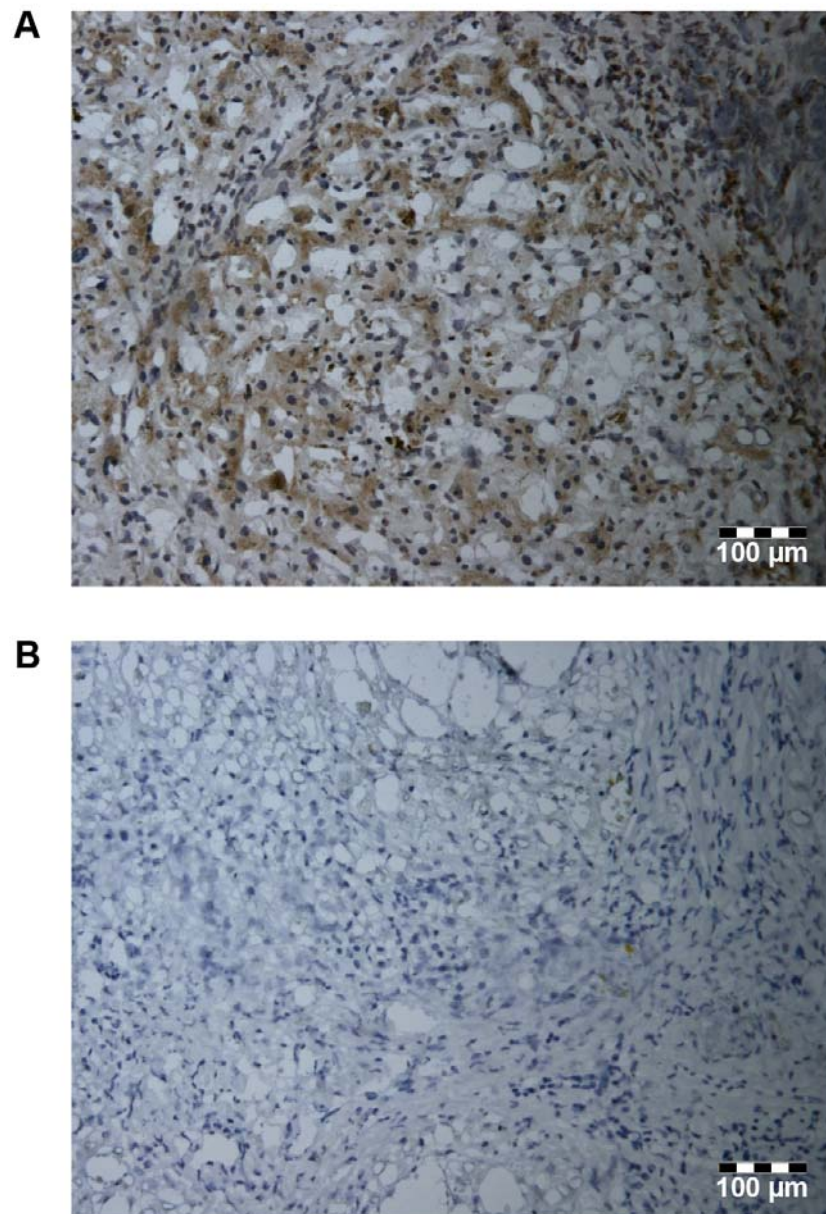


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis der IL-15 Expression im HCC-umgebenden zirrhotischen Gewebe (A) und Negativkontrolle mit isotypischem IgG-Antikörper (B).

Eine positive Immunreaktion für IL-15 zeigte sich in Hepatozyten, Gallengangepithelzellen sowie in den periportalen Feldern. In nicht-parenchymalen Zellen konnte keine

Immunoreaktivität nachgewiesen werden. Die IL-15-Färbung der Hepatozyten ist hauptsächlich im Zytoplasma in Form rotbräunlicher Granula lokalisiert (Abb.23 A und 24). Eine IL-15-Immunoreaktivität konnte in allen Gewebeproben, vom Normalgewebe über Fibrosen zu Zirrhosen und HCC-umgebenden Zirrhosen in unterschiedlicher Intensität dargestellt werden.

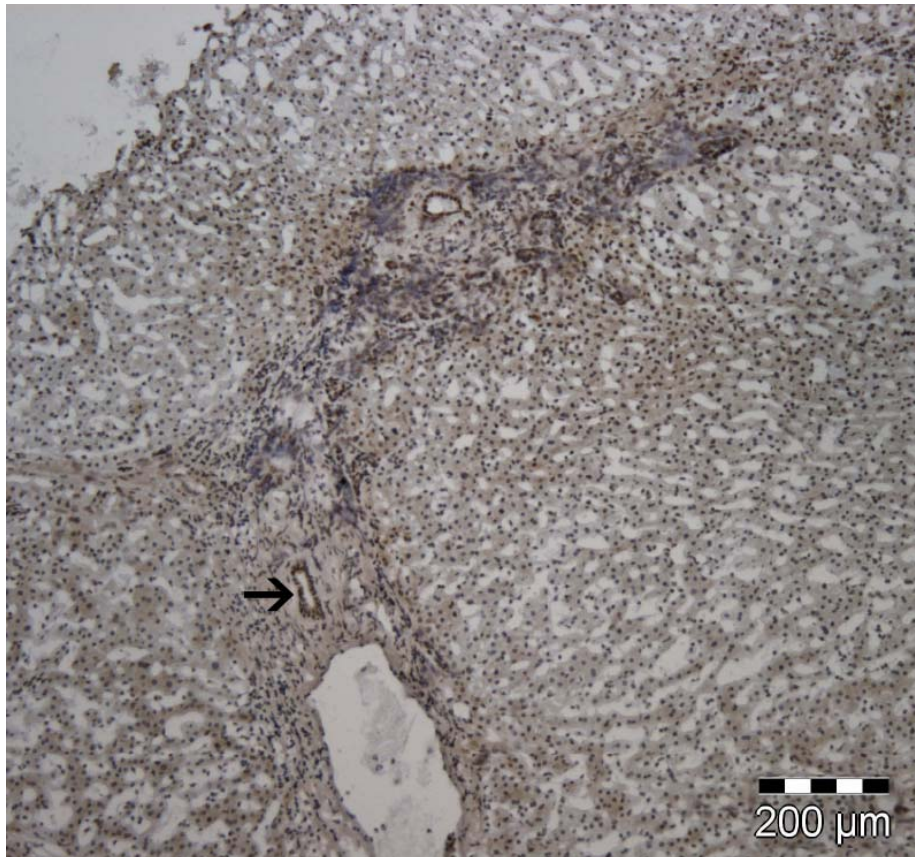


Abbildung 24: Anti-IL-15-Färbung eines zirrhotischen Lebergewebes bedingt durch Hepatitis B. Es zeigt sich eine Anreicherung von IL-15 sowohl im Zytoplasma der Hepatozyten in Form von rotbräunlichen Granula sowie im periportalen Feld. Links unten im Bild ist ein kleiner Gallengang angeschnitten, dessen Epithelzellen ebenfalls eine deutliche Anfärbung (→) aufweisen.

Die semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung erfolgte zum einen auf Basis der Intensität der Färbung (Grad 0-3, Abb.25), auf der anderen Seite aufgrund der Anzahl der IL-15-positiven Zellen (%). Bei Geweben, die sich nicht eindeutig einer Intensität zuordnen ließen, erfolgten entsprechende Abstufungen. Darüber hinaus wurde ein Score gebildet, der beide Parameter vereint (Intensität der Färbung x Anzahl der IL-15-positiven Zellen), um die Gesamtmenge an synthetisiertem IL-15 Protein besser abschätzen zu können.



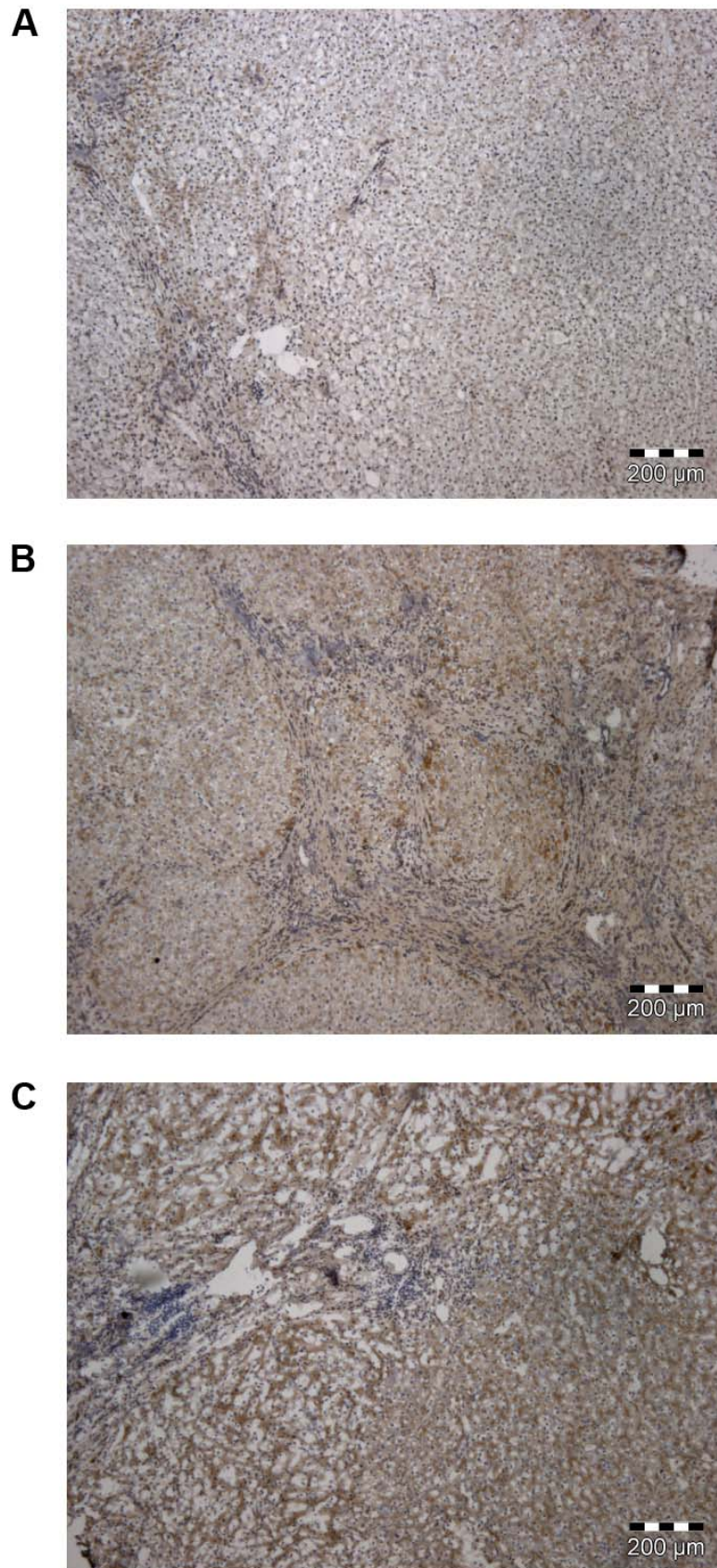


Abbildung 25: Einteilung der verschiedenen Färbeintensitäten der anti-IL-15-immunhistochemischen Färbung. A) Grad 1: schwache Färbung; B) Grad 2: mäßige Färbung; C) Grad 3: starke Färbung.

Die Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung mit der Gewebediagnose ergab einen Anstieg vom Normalgewebe bis hin zum zirrhotischen Gewebe, entsprechend den Ergebnissen der IL-15 mRNA Expression (Abb.26). Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

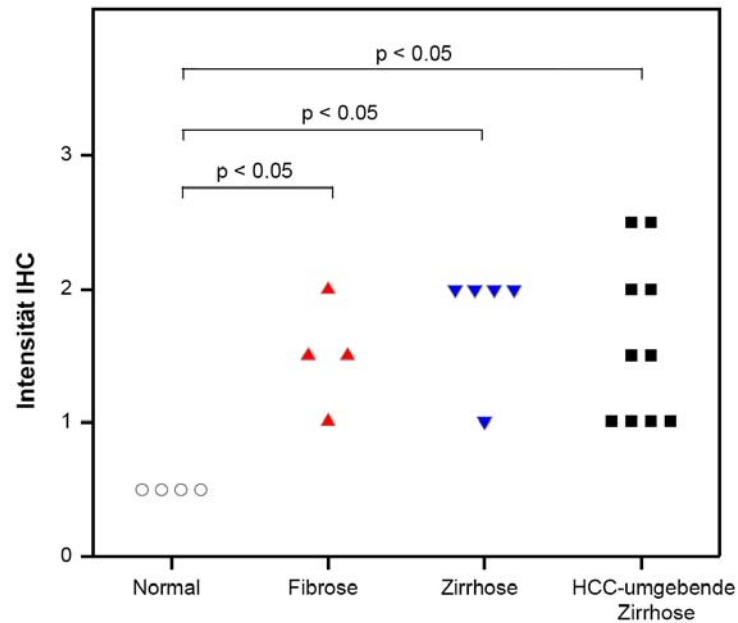


Abbildung 26: Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung (IHC) mit der Gewebediagnose.

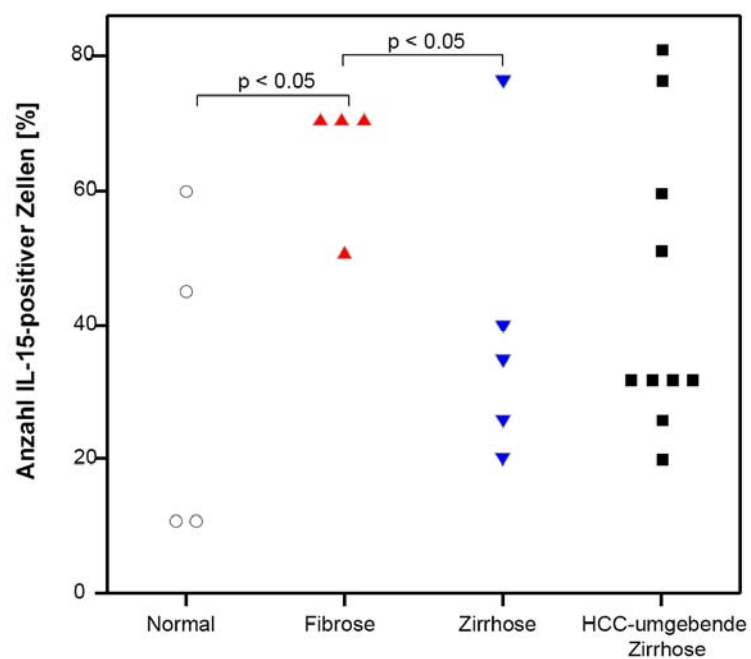


Abbildung 27: Korrelation der Anzahl der IL-15-positiven Zellen mit der Gewebediagnose.

Hinsichtlich der Anzahl der IL-15-positiven Zellen ließ sich kein linearer Zusammenhang mit zunehmender Fibrogenese darstellen. Fibrotische Lebergewebe scheinen eine erhöhte Anzahl IL-15-positiver Zellen im Vergleich zum Normalgewebe und zu zirrhotischem Gewebe aufzuweisen (Abb.27). Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

Die Analyse der Korrelation der Gewebediagnose mit dem immunhistochemischen Score (Intensität der Färbung x Anzahl der IL-15-positiven Zellen) zeigte einen statistisch signifikanten niedrigeren Score im Normalgewebe im Vergleich zu fibrotisch und zirrhotisch veränderten Lebergeweben sowie HCC-umgebenden Lebergeweben (Abb.28). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied innerhalb der pathologisch veränderten Gewebe nachgewiesen werden. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

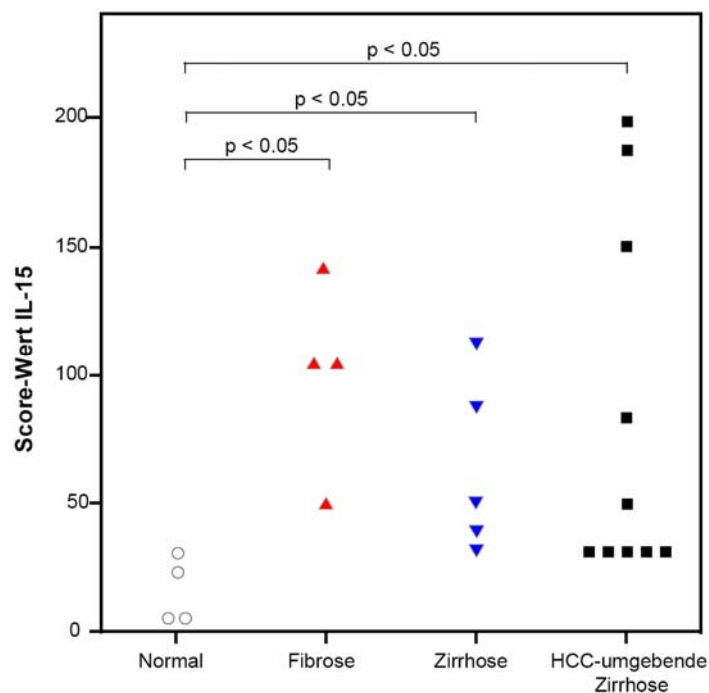


Abbildung 28: Korrelation des immunhistochemischen Scores für IL-15 (Intensität der anti-IL-15-Färbung x Anzahl der IL-15-positiven Zellen) mit der Gewebediagnose.

Weiterhin wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit den erhobenen klinischen, laborchemischen und histopathologischen Daten bezüglich einer Korrelation analysiert. Es konnten keine statistisch gesicherten Zusammenhänge gefunden werden. Interessanterweise konnte kein Zusammenhang der Intensität der anti-IL-15-Färbung oder der Anzahl der IL-15-produzierenden Zellen mit dem Vorhandensein von

Entzündungsinfiltraten im Lebergewebe festgestellt werden. Die Analysen erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test zur Analyse zweier unabhängiger Gruppen bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Intensität der immunhistochemischen Färbung von IL-15 Protein bzw. der Anzahl der IL-15-produzierenden Zellen und CTP- bzw. MELD-Score. Auch bezüglich des Suchtmittelkonsums war kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachweisbar. Die Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test zur Analyse mehrerer unabhängiger Gruppen bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

## 4 Diskussion

Die Leberzirrhose ist nicht nur in Deutschland, sondern weltweit eine häufige Erkrankung mit weitreichenden Folgen. In Deutschland beträgt die Prävalenz der Leberzirrhose 0,5-0,8%. Vermutlich ist diese Zahl tatsächlich noch viel höher (Huber, 2001; Schuppan, 2008). Die Diagnose der Leberzirrhose ist schwierig, da die meisten Patienten anfangs asymptomatisch sind (Conn, 1993). Außerdem sind die Möglichkeiten zur Diagnose eingeschränkt; so gibt es beispielsweise keinen Serumparameter, der eine eindeutige Diagnose der Leberzirrhose zulässt (Friedmann, 2004). Wichtigste potentielle Spätkomplikation der Leberzirrhose ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (Schuppan, 2008). Patienten mit Leberzirrhose haben ein Risiko von 1-6% pro Jahr an einem HCC zu erkranken (Huber, 2001). 80-90% der HCC wiederum entstehen auf dem Boden einer Leberzirrhose (Ferlay, 2010). Die Therapiemöglichkeiten der Leberzirrhose sind ebenfalls begrenzt. Sie bestehen im Wesentlichen aus der Beseitigung der ursächlichen Noxe und Behandlung der Komplikationen. Ist der Fibrosierungsprozess jedoch bis zur Leberzirrhose fortgeschritten, liegt ein irreversibles Stadium vor (Hernandez-Gea, 2011). Als Ultima ratio bleibt dann nur noch die Lebertransplantation (Schuppan, 2008).

Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) beschreibt einen biologischen Prozess, der dazu führt, dass epitheliale Zellen ihre spezifischen Eigenschaften verlieren und sich in Zellen mit mesenchymalen Phänotyp umwandeln. Dadurch können sich die Epithelzellen aus ihrem Zellverband lösen und sich fortbewegen. EMT sorgt dafür, dass im Rahmen von Reparationsvorgängen in Organsystemen Fibroblasten und Fibroblasten-ähnliche Zellen entstehen und vermehrt Komponenten der Extrazellulärmatrix produziert werden. Zu den Organsystemen, in denen der Prozess der EMT vermutlich eine Rolle spielt, zählt unter anderem die Leber, in der die EMT einen wichtigen Faktor für die Entstehung von Fibrose und Zirrhose darstellen könnte (Kalluri, 2003). Ein wichtiger Marker beim Prozess der EMT ist der Verlust von E-Cadherin. Unter den Transkriptionsfaktoren, die zu einer Repression von E-Cadherin führen, stellt Snail den wichtigsten Inhibitor dar (Nieto, 2002). Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung ist in der vorliegenden Arbeit die Expression von Snail mRNA als wichtiger Vertreter der EMT-Marker in fibrotischen und zirrhotischen Lebergeweben untersucht worden.



IL-15 ist ein Zytokin, das in vielen Organen kontinuierlich von immunologischen und nicht-immunologischen Zellen exprimiert wird. Es ist ein Überlebenssignal für Lymphozyten, NK- und NKT-Zellen, stimuliert die Zellproliferation, verhindert eine Apoptose und fördert die Zelldifferenzierung vieler nicht-immunologischer Zellen. Bei Patienten mit Leberschäden durch chronische Hepatitis C-Infektion steigt Serum-IL-15 mit zunehmender Leberschädigung an. Die IL-15-Konzentration korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung, sodass postuliert wurde, dass IL-15 einen Faktor darstellen könnte, der den Entzündungsgrad der Leber widerspiegelt (Kakumu, 1997). Die genaue Funktion von IL-15 in der Leber ist jedoch unbekannt (Suzuki, 2006).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Hengstler an der Technischen Universität Dortmund wurde gezeigt, dass Mäuse, die 6 Wochen lang mit Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ) zur Induktion einer Leberfibrosierung behandelt wurden, eine signifikant erhöhte Expression an IL-15 mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Im Lebergewebe von IL-15<sup>-/-</sup>-Mäusen im  $\text{CCl}_4$ -Modell konnte deutlich weniger fibrotische Septenbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies weist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen IL-15 und der Entstehung von Leberfibrose und -zirrhose hin, der in der vorliegenden Arbeit mittels eines breiten Probenkollektivs an humanen Lebergeweben genauer analysiert werden sollte.

#### **4.1 Korrelation der IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit der Gewebediagnose**

IL-15 mRNA Expression zeigte in den vorliegenden Ergebnissen einen deutlichen Anstieg von Normalgewebe über fibrotische, fibrotisch-zirrhotische bis hin zu zirrhotischen Geweben. Zusätzlich lässt sich ein Trend von rein zirrhotischen Geweben zu HCC-umgebenden zirrhotischen Geweben erkennen. Die IL-15 mRNA Expression korreliert demnach mit fortschreitender Fibrogenese. Es bleibt jedoch unklar, ob IL-15 ursächlich an der Fibrosierung beteiligt ist oder ob die erhöhte Expression von IL-15 eine sekundäre Folge der Fibrosierung ist. Der Zusammenhang zwischen IL-15 und dem Fibrosierungsgrad der Leber wurde bereits in humanen Lebern von Hepatitis C-infizierten Patienten durch Messung der IL-15-Konzentration im Serum untersucht. Die Gewebe waren nach Normalgeweben, asymptomatischen Trägern des Hepatitis C-Virus, chronischen Virusträgern, Leberzirrhosen und HCC (n gesamt=81) unterteilt. Sie zeigten einen signifikanten Anstieg der IL-15-Konzentration in der genannten Reihenfolge (Kakumu, 1997).

Da die vorliegende Arbeit primär nicht die Rolle von IL-15 im hepatozellulären Karzinom, sondern in fibrotischen und zirrhotischen Geweben untersuchen sollte, wurden im Rahmen der Gewebeanalyse keine HCC-Gewebe hinsichtlich ihrer Expression von IL-15 mRNA untersucht. Die genannten Untersuchungen von Kakumu et al., die nicht nur ein entsprechendes Resultat bezüglich der Gewebeschädigung und der IL-15 Konzentration im Serum ergaben, sondern darüber hinaus einen hochsignifikanten Anstieg von Serum-IL-15 bei chronischen Hepatitis C-Trägern mit HCC, legen die Vermutung nahe, dass die IL-15 mRNA Expression in HCC-Geweben unterschiedlicher Ätiologie ebenfalls stark ansteigt. Aus diesen Überlegungen ließe sich ableiten, dass IL-15 nicht nur eine Rolle bei der Fibrogenese, sondern auch bei der Hepatokarzinogenese spielen könnte.

Eine Untersuchung der Expression von IL-15 und seinen Rezeptoren in verschiedenen murinen Leberschädigungsmodellen, primären Hepatozyten und zwei hepatischen Zelllinien ergab, dass IL-15 und seine Rezeptoren in normalen Lebergeweben kontinuierlich exprimiert werden, es jedoch zu einem Anstieg derselben während einer Schädigung des Lebergewebes kommt. Es wurde daher geschlussfolgert, dass IL-15 einen Faktor darstellt, der zur Regeneration geschädigter Lebergewebe beiträgt (Suzuki, 2006). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit lässt offen, ob IL-15 tatsächlich regenerative Fähigkeiten aufweist. Es ließe sich vermuten, dass die Expression von IL-15 mit steigendem Fibrosierungsgrad ansteigt, um im Rahmen eines „Wundheilungsprozesses“ eine Regeneration des Lebergewebes zu fördern. Den Ergebnissen entsprechend würde dies bedeuten, dass umso mehr IL-15 produziert wird, je fortgeschrittener die Gewebeschädigung ist – bis hin zum HCC, wo sich eine stark erhöhte IL-15 mRNA Expression vermuten lässt. Andererseits lässt sich auch die Hypothese ableiten, dass IL-15 das Fortschreiten einer Lebererkrankung durch Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation unterstützt anstatt zu ihrer Regeneration beizutragen. Auch in diesem Fall würde ein erhöhtes IL-15 direkt oder indirekt zu einer Leberschädigung führen, die dann bis hin zur Hepatokarzinogenese fortschreitet. Die Hypothese, dass IL-15 eine Rolle im Rahmen der Leberschädigung spielt, wird gestützt durch die Ergebnisse des IL-15<sup>-/-</sup>-Mausmodells der Arbeitsgruppe von Prof. Hengstler: IL-15<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen nach chronischer Leberschädigung deutlich weniger Fibrosierung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Um die Rolle von IL-15 im Lebergewebe genauer zu definieren, sind weitere funktionelle Untersuchungen notwendig, um die genauen IL-15-Aktivierungsmechanismen aufzuschlüsseln.

Bezüglich der Expression von Snail mRNA ließ sich kein linearer Anstieg mit der Fibroseentstehung und -progression des Gewebes feststellen. Es konnte eine signifikant erhöhte Expression an Snail mRNA in zirrhotischen Lebergeweben gegenüber fibrotisch veränderten Lebergeweben nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich kein signifikanter

Unterschied zwischen fibrotischen, zirrhotischen oder HCC-umgebenden Zirrrosen gegenüber Normalgeweben. Ein Anstieg der Snail mRNA Expression von fibrotischen zu zirrhotischen Geweben belegt, dass Snail bei zunehmender Fibrosierung vermehrt exprimiert wird. Es bleibt allerdings unklar, weshalb die Snail mRNA Expression im Normalgewebe mit der der zirrhotischen Gewebe vergleichbar ist. Bei den Normalgeweben könnte aufgrund der limitierten Fallzahl (n=11) eine erhöhte Streubreite vorliegen, welche ursächlich für die mangelnden Unterschiede sein könnte.

EMT wird als ein Prozess beschrieben, der an der Fibrosierung von Organen beteiligt ist (Iwano, 2002). Später wurde vermutet, dass EMT eine Rolle bei der hepatischen Fibrogenese spielt (Ikegami, 2007). Im Rahmen von chronischen Lebererkrankungen konnte eine Beteiligung von EMT an der Fibrosierung des Portaltrakts nachgewiesen werden (Rygiel, 2008). Für die renale Fibrose konnte die Beteiligung von EMT bereits bewiesen werden (Li, 2003; Zeisberg, 2010). Dieser Beweis steht für die Vorgänge in der Leber und damit der hepatischen Fibrosierung jedoch aus (Ikegami, 2007).

2007 wurden Forschungsergebnisse veröffentlicht, die die Herkunft von FSP-1 positiven Fibroblasten aus Hepatozyten durch EMT vermuten (Zeisberg, 2007). Auch in Gallengangzellen von Patienten mit PBC wurde EMT durch Detektion von FSP-1 in den PBC-Geweben im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen (Omenetti, 2008). FSP-1 gilt als Marker für die Transformation von epithelialen Zellen zu Fibroblasten (Iwano, 2002). Snail, in seiner Funktion als Repressor der Transkription von E-Cadherin, gilt als der wichtigste EMT-Marker (Nieto, 2002). Es wurde postuliert, dass Snail1 die TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose unterdrücke und EMT in adulten Hepatozyten induziere (Franco, 2010).

Allerdings wird die Vermutung des in der Leber stattfindenden EMT-Prozesses nicht einheitlich unterstützt. So propagierten Taura et al., dass Hepatozyten keine EMT durchlaufen würden. Die Hypothese wird auf den fehlenden Nachweis gestützt, dass die FSP-1 positiven Fibroblasten, die Hepatozyten entstammen, tatsächlich Komponenten der Extrazellulärmatrix im Rahmen der Leberfibrosierung produzieren. Es sei unklar, ob FSP-1 ein Marker für Fibroblasten in der fibrotisch veränderten Leber sei. In seiner Arbeit über die Kollagen-I-Expression der von Hepatozyten abstammenden Fibroblasten zeigte sich, dass Kollagen-I-produzierende Zellen in einem CCl<sub>4</sub>-Fibrosemodell bei Mäusen nicht von Hepatozyten abstammten. Auch konnte keine Expression von mesenchymalen Markern durch Hepatozyten festgestellt werden (Taura, 2010).

Bei der Untersuchung von EMT in murinem fibrotischen Lebergeweben mittels genetischem Labeling zeigte sich, dass EMT in Cholangiozyten nicht zur hepatischen Fibrosierung bei Mäusen beiträgt (Scholten, 2010). In-vitro-Untersuchungen zur Herkunft von Myofibroblasten ergaben, dass kultivierte primäre Cholangiozyten zwar grundsätzlich zu EMT fähig sind;

allerdings ließ sich dies in vivo weder für Cholangiozyten noch für Hepatozyten nachweisen (Chu, 2011). Kisseleva et al. argumentieren daher, dass Hepatozyten zwar keine EMT durchlaufen würden, dass jedoch experimentelle Fibrosemodelle (durch u.a. ein verkürztes Beobachtungsintervall) nie die komplette humane Leberfibrosierung nachstellen könnten, sodass nur ein entsprechendes Follow-up betroffener Patienten den EMT-Prozess in humanen Leberfibrosen und -zirrhosen nachweisen würde (Kisseleva, 2011).

Die vorliegenden Ergebnisse stützen die These, dass EMT an der Fibrogenese der Leber beteiligt ist, nur bedingt. Zwar lässt sich ein Anstieg der Snail mRNA Expression von fibrotisch zu zirrhotisch veränderten Geweben nachweisen. Allerdings fehlt der vermutete Anstieg der Snail mRNA Expression vom Normalgewebe hin über die Fibrose bis hin zur tumorumgebenden Leberzirrhose. Möglicherweise liegen einer Steigerung der Snail mRNA Expression komplexere Vorgänge als die Zunahme der Fibrosierung zugrunde, die das vorliegende Ergebnis erklären würden.

## **4.2 Korrelation der IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit der Ätiologie der Leberzirrhose**

Die Analyse der unterschiedlichen Ätiologien der Leberzirrhosen ergab weder für die Expression von IL-15 noch für die Expression von Snail mRNA einen signifikanten Unterschied innerhalb der verschiedenen auslösenden Erkrankungen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen IL-15 und Snail mRNA Expression bei alkoholtoxisch und viral bedingten Leberzirrhosen nachgewiesen werden. Auf die übrigen untersuchten Ätiologien sollte diese Aussage allerdings nur bedingt übertragen werden, da die vorliegenden Fallzahlen zu gering waren, um eine statistisch valide Aussage machen zu können.

Eine genauere Untersuchung der IL-15 mRNA Expression innerhalb der zirrhotisch veränderten und HCC-umgebenden Zirrhosen ergab jedoch, dass innerhalb der viral bedingten Zirrhosen die IL-15 mRNA Expression in Hepatitis C-infizierten Geweben signifikant erhöht gegenüber den Hepatitis B-bedingten Zirrhosen war. Dieses Ergebnis entspricht dem von Honda et al., die die Genexpression in Lebergeweben von Patienten mit Hepatitis B und Hepatitis C untersuchten. Hierbei zeigte sich, dass der IL-15-Rezeptor in Hepatitis C-bedingten Leberzirrhosen eine signifikant erhöhte Expression zeigte (Honda, 2001).

Das kumulative 5-Jahres-Risiko für die Entwicklung eines HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose beträgt für Hepatitis B-bedingte Leberzirrhosen in Europa 10%, für Hepatitis

C-bedingte Leberzirrhosen in Europa 17%, d.h. Hepatitis C-positive Träger haben ein höheres Risiko, später ein HCC zu entwickeln (Fattovich, 2004). Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass IL-15 im Serum insbesondere bei Patienten mit HCC besonders hoch exprimiert wird (Kakumu, 1997), unterstützt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit die Vermutung, dass IL-15 nicht nur eine Rolle bei der Fibrogenese, sondern auch bei der Hepatokarzinogenese spielen könnte.

### **4.3 Korrelation der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit CTP- und MELD-Score**

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils CTP- und MELD-Score auf einen potentiellen Zusammenhang mit der Expression von IL-15 und Snail mRNA untersucht.

Der CTP wurde 1973 entwickelt, um die Überlebensrate von Patienten mit Leberzirrhose vorhersagen zu können, die invasive Therapien wie endoskopische oder transjuguläre portosystemische Shuntanlagen erhalten sollten. Später wurde der CTP auch zur Einteilung der Patienten auf der Warteliste für Lebertransplantationen verwendet (Christensen, 2004). Zur genauen Berechnung des CTP siehe Tab.3. Der CTP, der lange Zeit zur Vergabe von Spenderlebern herangezogen wurde, zeigt jedoch einige Schwachpunkte. Die Variablen Aszites und hepatische Enzephalopathie unterliegen allein der subjektiven Bewertung des Arztes. Wurden diese Variablen genauer untersucht, etwa durch Ultraschall oder Elektroenzephalogramm, so resultierte oftmals ein unterschiedlicher Schweregrad der Zirrhose. Zudem unterliegt der Grad des Aszites und der hepatischen Enzephalopathie den Effekten therapeutischer Interventionen wie dem Einsatz von Diuretika, Albumin oder Laktulose. Außerdem lässt der CTP-Score durch nur drei Kategorien – Child A, B, oder C – keine feine Abstufung zu (Cholongitas, 2006).

Der MELD-Score wurde im Jahre 2000 von einer Forschungsgruppe der Mayo Klinik in den USA entwickelt und – im Gegensatz zum CTP - statistisch validiert. Er sollte die Überlebensrate von Patienten, die transjuguläre intrahepatische Shunts erhielten, vorhersagen. 2001 wurde der Score leicht modifiziert, um die Überlebenszeit von Patienten mit Leberzirrhose einschätzen zu können (Cholongitas, 2006). Im Gegensatz zum CTP beinhaltet der MELD-Score eine Beurteilung der renalen Funktion des Patienten (Serum-Kreatinin), die eine wichtige prognostische Rolle spielt (Durand, 2005). Der MELD-Score ermöglicht durch seine Skala von 6 bis 40 eine feinere Abstufung des Schweregrades der

Zirrhose. Er zeigte in der statistischen Validierung eine herausragende diagnostische Vorhersagekraft. Er schien dem CTP-Score überlegen und löste ihn 2002 bei der Einteilung von Transplantlebern in den USA ab (Cholongitas, 2006). Seit Dezember 2006 wird er auch von Eurotransplant verwendet (Schouten, 2012).

Nichtsdestotrotz hat auch der MELD-Score gewisse Limitierungen, die zu Kritik führten. So zeigten Studien, dass das Serum-Kreatinin, je nachdem, in welchem Labor es gemessen wurde, merklichen Schwankungen unterliegt. Darüber hinaus variiert die Konzentration des Kreatinins im Serum je nach Geschlecht, Alter und ethnischer Abstammung sowie Muskelmasse des Patienten. Kritiker des MELD-Scores merkten daher an, dass die Anwendung des MELD-Scores bei der Vergabe von Lebertransplantaten zu einer Diskriminierung von Frauen, hellhäutigen oder unterernährten Patienten führen kann (Cholongitas, 2006). Außerdem zeigte sich, dass verschiedene Verfahren zur Messung der INR in verschiedenen Transplantzentren zu signifikant unterschiedlichen MELD-Scores führten (Trotter, 2004).

Die Analyse der vorliegenden Arbeit zeigte keine Korrelation des CTP- oder MELD-Scores mit der Konzentration der IL-15 mRNA in zirrhotisch veränderten Lebergeweben. Eine hohe Expression von Snail mRNA hingegen korreliert signifikant sowohl mit zunehmendem CTP- als auch MELD-Score. Nachdem sowohl CTP- als auch MELD-Score dazu dienen, einen Gesamteindruck des aktuellen klinischen und laborchemischen Zustand des Patienten zu ermitteln und dadurch eine Prognose hinsichtlich seiner Überlebenszeit zu ermöglichen, ließe sich aus diesem Ergebnis ableiten, dass eine erhöhte Snail mRNA mit einer verringerten Überlebensprognose des Patienten einhergeht. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht in den Überlebensanalysen der Patienten in Abhängigkeit von der Snail mRNA Expression nachgewiesen werden. In Anbetracht der erwähnten Ungenauigkeiten bei der Erhebung von CTP- bzw. MELD-Score ist es schwierig die Aussagekraft hinsichtlich einer prognostischen Einschätzung durch die Expression von Snail und IL-15 mRNA bei Leberzirrhosen definitiv zu bewerten. Vielmehr sollte sie im Zusammenhang mit den tatsächlich gemessenen Überlebensraten der Patienten gesehen werden (s. Kap. 3.2.5).

#### **4.4 Korrelation der IL-15 mRNA und Snail mRNA Expression mit histopathologischen Veränderungen, klinischen Merkmalen und laborchemischen Daten**

In der vorliegenden Arbeit wurden klinische und laborchemische sowie histopathologische Daten erhoben, die das jeweilige Gewebe und den zugehörigen Patienten charakterisieren. Eine Analyse der Korrelation dieser Daten mit der Expression von Snail und IL-15 mRNA soll neue Erkenntnisse bezüglich der Rolle und Funktion der beiden Faktoren liefern.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lebergewebeproben zeigten hinsichtlich der Expression von IL-15 bzw. Snail mRNA zunächst keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Geschlechts der Patienten. Die Analyse der nur komplett zirrhotisch umgebauten Gewebe ergab bemerkenswerterweise, dass die IL-15 mRNA Expression bei weiblichen Patienten signifikant erhöht gegenüber der Expression bei männlichen Patienten ist. Ein umgekehrtes Ergebnis zeigte sich für Snail: Gewebe von Männern mit Leberzirrhose weisen eine signifikant erhöhte Snail mRNA Expression gegenüber der Gewebe von Frauen auf. Da beide Gruppen (♂: n=88; ♀: n=33) ungleich verteilt waren, ist eine Interpretation des Ergebnisses nur unter Vorbehalt möglich. Die vorliegende Verteilung der Gruppen repräsentiert möglicherweise die deutlich höhere Inzidenz der Leberzirrhose bei Männern im Vergleich zu Frauen (Massard, 2006).

Die erhöhte Expression von Snail mRNA, einem EMT-Marker, der erwartungsgemäß bei Leberzirrhose ansteigen sollte, in Zusammenhang mit männlichem Geschlecht könnten als Hinweis gedeutet werden, dass das männliche Geschlecht einen Risikofaktor für die EMT darstellen könnte. Das männliche Geschlecht als Risikofaktor für eine Leberzirrhose generell ist ein bereits in der Literatur beschriebenes Phänomen (Massard, 2006).

Die erhöhte IL-15 mRNA Expression bei Frauen könnte auf eine hormonelle Regulierung der IL-15 Expression hindeuten, die sich allerdings in dieser Ausprägung nur bei einem weit fortgeschrittenen Prozess der Fibrosierung, der kompletten Leberzirrhose, zeigt. In der Literatur finden sich dazu kaum Daten. Allerdings konnte Okada nachweisen, dass Progesteron die Produktion von IL-15 in endometrialen Stromazellen stimuliert (Okada, 2000). Es ist jedoch fraglich, inwieweit sich aus diesem Ergebnis Rückschlüsse auf die Vorgänge in der Leber ziehen lassen.

Kein Zusammenhang zwischen IL-15 und Snail mRNA Expression zeigte sich für die Parameter Alter und das Vorhandensein von Adipositas, Diabetes, arterieller Hypertonie und Hyperurikämie. Bemerkenswerterweise ergab die Analyse einen signifikanten

Zusammenhang zwischen der IL-15 mRNA Expression und dem Vorhandensein einer Hypercholesterinämie. Es handelt sich allerdings um sehr ungleich verteilte Gruppen (Hypercholesterinämie n=13; keine Hypercholesterinämie n=130). Darüber hinaus ist in Anbetracht veröffentlichter epidemiologischer Daten eine sehr viel höhere Prävalenz der Hypercholesterinämie in der untersuchten Population (höheres Alter, Einwohner eines Industrielands) zu erwarten, sodass davon auszugehen ist, dass sich innerhalb der 130 Patienten noch mehr Patienten mit noch nicht diagnostizierter Hypercholesterinämie mangels entsprechender Abklärung von ärztlicher Seite aus befinden. Nichtsdestotrotz könnte erhöhtes Cholesterin, was bekanntermaßen im Rahmen der NASH einen Einfluss auf die Entstehung einer Leberzirrhose hat, auch die Expression von IL-15 mRNA beeinflussen bzw. IL-15 umgekehrt einen Effekt auf die Cholesterinkonzentration im Serum haben (Marchesini, 2003). In Untersuchungen des Zusammenhangs von IL-15 und Arteriosklerose konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit Hypercholesterinämie eine deutlich erhöhte Expression von IL-15 in Milz und Blut aufwiesen (Van Es, 2011). Um in der vorliegenden Arbeit eine valide Aussage zur Bedeutung des Zusammenhangs von IL-15 und Hypercholesterinämie machen zu können, müsste das untersuchte Patientenkollektiv jedoch nochmals gezielter hinsichtlich seines Lipidprofils untersucht werden.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen Alkoholkonsum der Patienten und Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA im Lebergewebe zeigte, dass sowohl IL-15 als auch Snail mRNA bei Patienten mit Alkoholkonsum in der Vorgeschichte (Z.n. Abusus) hoch exprimiert waren. Die IL-15 mRNA Expression war bei diesen Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten, die keinen oder gelegentlichen Alkoholkonsum (entspricht 20g reiner Alkohol/Tag für Frauen und 40g/Tag für Männer) angegeben hatten. Snail mRNA wies eine deutlich erhöhte Expression bei Patienten mit Z.n. Abusus gegenüber Patienten mit keinem und gelegentlichem Konsum sowie gegenüber Patienten, die einen aktiven Alkoholabusus (♀ >20g Alkohol/Tag; ♂ >40g/Tag) aufwiesen. Es ist wenig bekannt darüber, welchen Effekt Alkoholkonsum auf IL-15 hat (Zhang, 2005). Akuter Alkoholkonsum führt zu einer Inhibition der IL-15 mRNA Expression (Pruett, 2003). Eine Untersuchung des Effekts von chronischem Alkoholkonsum auf die Population der peripheren NK-Zellen zeigte einen biphasischen Verlauf der NK-Zellproliferation: Kurzfristiger Alkoholkonsum (2 Wochen) führt demnach zu einer Inhibition der NK-Zellproliferation, während langfristiger Alkoholkonsum (3 Monate) eine Zunahme der NK-Zellproliferation zur Folge hat. Die unter chronischem Alkoholkonsum proliferierten NK-Zellen weisen jedoch eine deutlich erhöhte Apoptoserate auf (Zhang, 2009). Nachdem die Homöostase der NK-Zellen IL-15-abhängig ist und IL-15 auch das Überleben der NK-Zellen sichert (Burkett, 2004; Baccala, 2005), würde sich aus diesen Ergebnissen folgender Rückschluss ziehen lassen: Eine niedrige IL-15 Expression bei kurzfristiger



Schädigung ginge mit einer folglich niedrigen Anzahl an NK-Zellen einher, während eine chronisch einwirkende Noxe zu einer erhöhten IL-15 Expression mit einer folgenden Proliferation von jedoch wenig widerstandsfähigen NK-Zellen führe. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich der Anstieg der IL-15 mRNA Expression weniger bei Patienten mit aktivem Abusus als vielmehr bei Patienten mit einem Alkoholabusus in der Vorgeschichte. Patienten, die einen „Z.n. Abusus“ aufwiesen, scheinen auf den ersten Blick ein geringeres Schädigungsmuster als Patienten mit aktivem Abusus aufzuweisen. Tatsächlich handelt es sich zum überwiegenden Teil um Patienten, deren Lebergewebe derartig geschädigt ist, dass als therapeutische Ultima Ratio nur noch eine Lebertransplantation infrage kommt. Bekanntermaßen ist die Voraussetzung für die Listung zur Lebertransplantation eine mindestens 6 Monate bestehende vollständige Alkoholkarenz (Bundesärztekammer, 2013), die in den Patientenunterlagen als „Z.n. Abusus“ dokumentiert wird. Daraus ließe sich ableiten, dass es sich bei den Geweben von Patienten mit einem „Zustand nach Abusus“ um deutlich stärker geschädigte und dadurch ausgeprägt zirrhotisch veränderte Lebergewebe im Vergleich zu den Patienten mit „aktivem Abusus“ handelt. Diese durch die Noxe Alkohol derartig veränderten Lebergewebe weisen eine erhöhte Expression an IL-15 mRNA auf. Dies wiederum entspricht dem Ergebnis zur Gewebediagnose: Zunahme der IL-15 mRNA Expression bei Progredienz der Fibrogenese. Um festzustellen, inwieweit sich die Proliferation und das Überleben der IL-15-abhängigen NK-Zellen bei einem Z.n. Alkoholabusus und entsprechend erhöhter IL-15 mRNA Expression entwickeln, sind weitere Untersuchungen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit fand sich die höchste Expression von Snail mRNA in Geweben von Patienten mit Alkoholabusus in der Vorgeschichte, die niedrigsten bei Patienten mit gelegentlichem Alkoholkonsum. Aus der Literatur ist bekannt, dass TGF- $\beta$  einer der wichtigsten Faktoren ist, der EMT induziert (Kalluri, 2009). Es fördert die Expression von Snail, indem es direkt an den Snail-Promoter bindet (Wu, 2010). Analysen zeigten, dass TGF- $\beta$  alkoholinduzierten Leberschaden fördert, indem es die Alkoholdehydrogenase herunterreguliert (Ciucan, 2010). Alkoholkonsum umgekehrt scheint zu einem Anstieg der Expression von TGF- $\beta$  zu bewirken. Dieses wiederum führt dann zu einer gesteigerten Induktion von EMT, die in der Folge in einer Fibrosierung der Leber endet (Meindl-Beinker, 2008). Unter der Voraussetzung, dass es sich bei den Geweben mit „Z.n. Abusus“ um besonders ausgeprägte Zirrhosen handelt, ließe sich vermuten, dass auch der EMT-Marker Snail im Rahmen der Fibrogenese bei chronischer Schädigung ansteigt.

Bezüglich der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse zum Alkoholkonsum der Patienten ist kritisch zu sehen, dass die Angaben zum Alkoholkonsum, die anamnestisch erhoben

werden, meist unzuverlässig sind. Daneben halten sich wenige Ärzte an eine objektive Vorgabe, ab welchem Grenzwert Alkoholkonsum noch als "gelegentlich" oder bereits als "Abusus" bezeichnet wird. Über eine klare Definition hierfür ist sich auch die Literatur noch uneinig, es fehlen klare einheitliche Angaben (Ottomanelli, 1999). Für eine zuverlässige Datenerhebung bedarf es objektiver Kriterien zur Klassifizierung des Alkoholkonsums, z.B. die gezieltere Anamnese mittels detaillierter Fragebögen und/oder die Bestimmung aussagekräftiger Serumparameter.

Die Untersuchung der Korrelation von Snail mRNA Expression im Lebergewebe und dem Vorhandensein histopathologischer Veränderungen zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher Snail mRNA Expression und dem Vorhandensein von Nekrosen im Lebergewebe. Histopathologisch lassen sich Nekrosen vor allem bei Hepatitis-B und -C-bedingter Leberzirrhose nachweisen (Hernandez-Gea, 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit liegen den Gewebeproben, die Nekrosen aufweisen (n=21), zu einem großen Teil virale Hepatitiden zugrunde (n=8). Nekrose ist definiert als pathologischer Zelltod, bei dem es zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes kommt, durch die Makrophagen angelockt werden (Kaczmarek, 2013). Die Makrophagen schütten Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  aus, die wiederum eine Stimulation von Snail bewirken (Fehninger, 2001; Techasen, 2012). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit stützt also die Vermutung, dass eine nekrotische Umwandlung im Lebergewebe mit einer Stimulation der Expression von Snail mRNA einhergeht, die wiederum zur Fibrogenese führt.

Für IL-15 ergab sich keine Korrelation mit dem Vorhandensein von Entzündungsinfiltraten, Verfettung und Nekrosen. Es zeigte sich jedoch eine signifikant erhöhte Expression von IL-15 mRNA bei Geweben, die keine Cholestase aufwiesen, im Vergleich zu Geweben mit vorhandener Cholestase. Für IL-15, das bekanntermaßen eine Vielfalt an immunologischen Zellen zur Proliferation und Aktivierung stimuliert, wurde eine erhöhte Menge an Entzündungsinfiltraten erwartet. Auch die Arbeiten von Zhou stellten keinen Zusammenhang der Menge an IL-15 Protein im Lebergewebe mit dem Entzündungsgrad des Lebergewebes fest. Daher wurde vermutet, dass neben der inflammatorischen Antwort des Lebergewebes noch andere Faktoren einen Einfluss auf die IL-15 Produktion haben, wie etwa T-Zellen und die genetische Konstitution (Zhou, 2010).

Über einen Zusammenhang zwischen IL-15 und Cholestase lassen sich in der Literatur keine Untersuchungen finden. Cholestase kann grundsätzlich durch prä-, intra- und posthepatische Prozesse entstehen (Zollner, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Leberfibrosen und -zirrhosen sind in der überwiegenden Mehrheit durch intrahepatischen Schaden entstanden. Vorausgesetzt, dass Cholestase als Zeichen eines weit fort-

geschrittenen Leberschadens zu werten ist (Zollner, 2007), könnte das vorliegende Ergebnis – hohe IL-15 mRNA Expression bei nicht vorhandener Cholestase – eine potentielle Rolle von IL-15 als regenerativen oder protektiven Faktor bei cholestatischen Lebererkrankungen unterstreichen. Jedoch ist zu bedenken, dass bei der Analyse der Cholestase sehr ungleich verteilte Gruppen vorlagen, sodass Hypothesen nur unter Vorbehalt formuliert werden können.

In den Analysen der laborchemischen Daten im Zusammenhang mit der IL-15 und Snail mRNA Expression konnten signifikante Korrelationen zwischen erhöhter IL-15 mRNA Expression und erhöhter GOT sowie AFP nachgewiesen werden. Die GOT ist ein Enzym, welches in Zytoplasma und Mitochondrien der Hepatozyten vorliegt (Niemelä, 2010). Sie wird bei einer Leberschädigung freigesetzt und ist dann im Serum des Patienten nachweisbar. Im Vergleich zur GPT ist die GOT jedoch wenig leberspezifisch (Kunutsor, 2013). Der Zusammenhang mit einer erhöhten IL-15 mRNA Expression unterstreicht daher die Rolle von IL-15 als einen Faktor, der im Rahmen der Gewebeschädigung exprimiert wird, gibt jedoch über seine Funktion im Lebergewebe wenig Aufschluss.

AFP wird bei ca. 70% der Patienten mit HCC im Tumorgewebe exprimiert und kann im Serum gemessen werden (Huber, 2001). Das vorliegende Ergebnis, eine erhöhte AFP-Serumkonzentration bei erhöhter IL-15 mRNA Expression im Lebergewebe, weist daher auf eine potentielle Rolle von IL-15 im Rahmen der Hepatokarzinogenese hin. Kritisch zu sehen ist, dass der Grenzwert der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg mit 8,1 ng/ml sehr niedrig angesetzt ist. Bei Analysen mit einem Grenzwert von 10 ng/ml ließ sich die statistische Signifikanz nicht mehr nachweisen. Daher sollten von diesem Ergebnis abgeleitete Hypothesen eher zurückhaltend formuliert werden. Laut Huber et al. ist die Spezifität des AFP für das HCC erst ab einem Wert von 100 ng/ml hoch. Dennoch sollte auch ein ausgeprägt erhöhtes AFP aufgrund seiner mangelnden Sensitivität immer in Kombination mit den Befunden z.B. eines bildgebenden Verfahrens gewertet werden (Huber, 2001).

## **4.5 Korrelation der Expression von IL-15 und Snail mRNA mit dem Patientenüberleben**

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA in allen Lebergewebeproben hinsichtlich eines Zusammenhangs mit dem Patientenüberleben untersucht. Hierbei zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation. Die Analyse der zirrhotisch veränderten Geweben allein, d.h. reine Zirrhosen und HCC-umgebende Zirrhosen, ergab ein längeres Überleben der Patienten mit hoher IL-15 mRNA Expression im Lebergewebe in den ersten postoperativen Jahren nach Leberresektion gegenüber Patienten mit einer niedrigen IL-15 mRNA Expression. Die Überlebenskurven nähern sich jedoch im 4. postoperativen Jahr aneinander an, sodass es sich um ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis handelt. Analysen der Expression von IL-15 Protein in peritumoralen Lebergeweben bei Patienten mit HCC nach kurativer Leberresektion ergaben, dass eine erhöhte IL-15 Proteinsynthese mit einem längeren HCC-rezidivfreien Intervall und verlängertem Überleben der Patienten assoziiert war (Zhou, 2010). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt die Gruppe der HCC-umgebenden zirrhotischen Gewebe untersucht. Erneut zeigte sich ein Trend, jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied für verlängertes Überleben bei Patienten mit peritumoraler Leberzirrhose, die eine hohe Expression an IL-15 mRNA aufwiesen. Dieses Ergebnis könnte die Hypothese unterstützen, dass IL-15 im Rahmen der Leberzirrhose regenerative Fähigkeiten besitzt (Suzuki, 2006). Kritisch zu sehen ist, dass in der vorliegenden Statistik relativ kleine Fallzahlen involviert sind, die zulasten der statistischen Aussagekraft der Kaplan-Meier-Kurve fallen. Eventuell besteht ein statistisch signifikanter Unterschied, der sich in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisen lässt und weiterer Analysen mit größeren Fallzahlen bedarf.

Für die Expression von Snail mRNA ließe sich eine inverse Korrelation mit dem Patientenüberleben erwarten, da EMT-Marker als in Zusammenhang mit Tumormetastasierung stehend gelten (Kalluri, 2009). Allerdings zeigte sich auch bei alleiniger Betrachtung der HCC-umgebenden Zirrhosen kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Analysen, die Snail-Protein in HCC-Geweben untersuchten, zeigten, dass eine erhöhte Snail-Konzentration mit einer verringerten E-Cadherin Konzentration und einer schlechten Differenzierung des HCC einherging. War die Snail Expression immunhistochemisch nachweisbar, die E-Cadherin Expression jedoch nicht, konnte ein direkter Zusammenhang mit einer signifikant erhöhten postoperativen Rezidivrate festgestellt werden (Woo, 2011). Auch eine Untersuchung der Snail mRNA Expression im HCC ergab eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter Snail mRNA Expression und einer schlechteren Prognose

(Miyoshi, 2005). Im Gegensatz zu den genannten Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht direkt HCC-Gewebe, sondern HCC-umgebendes zirrhotisches Gewebe untersucht. Als Fazit aus den durchgeführten Untersuchungen und den Ergebnissen in der Literatur lässt sich daher ableiten, dass die erhöhte Snail mRNA Expression im HCC-Gewebe selbst, nicht aber im peritumoralen Gewebe, mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

## **4.6 Nachweis von IL-15 im Lebergewebe**

Eine Rolle von IL-15 im Rahmen vieler verschiedener Erkrankungen des menschlichen Organismus konnte mittlerweile belegt werden. Viele Gewebe scheinen IL-15 mRNA zu exprimieren (Grabstein, 1994), allerdings konnte bisher nur in wenigen Zellen eine Produktion von IL-15 Protein bewiesen werden (Yoshikai, 2000). Bezüglich der IL-15 Expression im Lebergewebe konnte IL-15 mRNA bereits in humanen Lebergewebebiopsien sowie in hepatozytären Zellkultur-Linien nachgewiesen werden (Rowell, 1997; Cookson, 2003). Kultivierte primäre Hepatozyten und hepatische Zelllinien produzieren IL-15 Protein (Suzuki, 2006). Das Vorhandensein von mRNA gibt einen wichtigen Hinweis auf die Proteinsynthese im Gewebe. Allerdings unterliegen gerade Zytokine oft einer strengen translationalen Regulation, sodass es sinnvoll ist, die Menge an produziertem Protein zu detektieren, um eine Aussage über den tatsächlichen physiologischen Effekt des Proteins machen zu können.

In einer Analyse der Expression von IL-15 Protein mittels ELISA in normalem und pathologisch verändertem Lebergewebe (11 Hepatitis-C-bedingte Leberzirrhosen und 9 alkoholtoxisch bedingte Lebererkrankungen) wurde sowohl in den normalen als auch in den pathologisch veränderten Lebergeweben IL-15 nachgewiesen. Dabei zeigten normale und durch Alkoholabusus veränderte Lebergewebe eine vergleichbare Menge an IL-15, während sie im Hepatitis-C-infizierten Lebergewebe deutlich erhöht war. In immunhistochemischen Färbungen fand sich IL-15 vor allem im Portaltrakt; außerdem waren nicht-parenchymale Zellen, bei denen es sich am ehesten um Kupffer-Zellen handelte, sowie mononukleäre Zellen, am ehesten infiltrierende Monozyten, positiv für IL-15 (Golden-Mason, 2004). In einer weiteren Arbeit wurde das Vorhandensein von IL-15 in peritumoralen Geweben von HCC-Herden und im HCC-Gewebe selbst untersucht. Dazu wurde IL-15 mithilfe eines primären anti-IL-15-Mausantikörpers detektiert. Positiv für IL-15 waren vor allem das Zytoplasma von Hepatozyten und Tumorzellen, aber nur wenige Lymphozyten (Zhou, 2010).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich IL-15 Protein vor allem in Hepatozyten nachweisen lässt. Auch im periportalen Bereich und speziell in den Gallengangepithelzellen konnte eine Anfärbung von IL-15 Protein dargestellt werden. Diese Befunde bestätigen die in der Literatur vorliegenden Erkenntnisse. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Intensität, nicht aber die Anzahl der angefärbten Zellen, mit zunehmendem Fibrosierungsgrad zunimmt. Es lässt sich daher vermuten, dass eine Zunahme der IL-15 Proteinsynthese in der Leber im Rahmen der Fibrogenese nicht durch eine zunehmende Anzahl von aktivierten Zellen zustande kommt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die IL-15 exprimierenden Zellen eine stärkere Aktivierung erfahren, wodurch eine erhöhte Proteinsynthese resultiert. Die weiteren statistischen Analysen hinsichtlich klinischer, laborchemischer und histopathologischer Parameter zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit der Intensität der immunhistochemischen Färbung. Das vorliegende Ergebnis stützt die Hypothese, dass die IL-15 mRNA Expression im Rahmen der Fibrosierung zu einer vergleichbaren Synthese des IL-15 Proteins führt. Diese Menge an IL-15 Protein entsteht jedoch nicht durch eine erhöhte Anzahl an Zellen, sondern durch eine erhöhte Aktivität der IL-15 produzierenden Zellen. Um diese Beobachtung zu verifizieren bedarf es jedoch einer größeren Anzahl von Gewebeproben, um statistisch valide Aussagen machen zu können.

#### **4.7 IL-15 und Snail als Biomarker und/oder therapeutisches Target?**

Eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit war es, mithilfe der Analyse der Expression von IL-15 und Snail mRNA in hepatischen Geweben zu evaluieren, ob IL-15 und Snail für einen Einsatz als Biomarker geeignet wären. Biomarker sind per definitionem messbare Moleküle, Zellen, Gene oder Organfunktionen, die eine Aussage über eine Erkrankung hinsichtlich des Risikos ihres Auftretens, ihres Vorliegens, ihres Verlaufs oder des Ansprechens der Erkrankung auf eine Therapie ermöglichen (Endres, 2008). Die Expression von Snail mRNA zeigte weder hinsichtlich der Progression der Fibrogenese in Leberzirrhosen noch hinsichtlich des Patientenüberlebens signifikante Zusammenhänge. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit würde es sich daher weder für einen Einsatz als Biomarker noch als therapeutischen Angriffspunkt eignen. Insgesamt wird das Vorhandensein von EMT im Rahmen der Leberzirrhose sehr kontrovers diskutiert (s.Kap.4.1). Ansätze für therapeutische Interventionen unter Einbezug von Snail sind bisher nicht versucht worden.

IL-15 mRNA, deren Expression in der vorliegenden Arbeit einen klaren Anstieg mit zunehmender Fibrosierung aufwies, könnte jedoch ein vielversprechender Kandidat für einen Biomarker oder für einen therapeutischen Ansatz sein: Eine erhöhte Expression von IL-15 mRNA weist zunächst auf einen fortgeschrittenen Prozess der Fibrosierung in der Leber hin. Vor dem Hintergrund, dass die IL-15 mRNA Expression in der vorliegenden Arbeit einen leicht ansteigenden Trend von zirrhotisch veränderten Geweben zu HCC-umgebenden Zirrhosen zeigt, wie auch in Anbetracht der Untersuchungen von Kakumu et al. (1997), die deutlich erhöhte IL-15-Serumkonzentrationen bei humanen HCC-Geweben aufwiesen, könnte eine Verwendung von IL-15 als Marker im Rahmen der HCC-Diagnostik diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner ein Trend zwischen der Expression von IL-15 mRNA und dem Patientenüberleben nach kurativer Leberresektion festgestellt werden. Demnach leben Patienten mit erhöhter IL-15 mRNA Expression im zirrhotischen Lebergewebe in den ersten postoperativen Jahren tendenziell länger als Patienten mit niedriger Expression von IL-15 mRNA. Auch Zhou et al. zeigten, dass erhöhte Level von IL-15 Protein in peritumoralem und HCC-Gewebe der Leber mit einer verringerten HCC-Rezidivrate und einer verlängerten Überlebensrate nach kurativer Tumorresektion assoziiert waren. Darüber hinaus können laut dieser Arbeit anhand der Höhe der peritumoralen IL-15 Expression prognostische Aussagen hinsichtlich des Outcomes bei HCC im Frühstadium (ohne mikrovaskuläre Invasion) gemacht werden. Des Weiteren wurde vermutet, dass eine effektive Immunmodulation mit IL-15 einen tumorkontrollierenden und lebensverlängernden Effekt haben könnte (Zhou, 2010). Die Möglichkeit eines Einsatzes von IL-15 zur Anti-Tumorthherapie wurde auch schon von anderen Autoren propagiert (u.a. Jakobisiak, 2011, s.u.).

IL-15 beeinflusst die Stimulierung und Aktivierung von Effektor- und Gedächtnis-CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK- und NKT-Zellen, die alle im Sinne einer Anti-Tumor-Immunantwort agieren, sodass IL-15 ein wichtiger Faktor im Rahmen einer Tumor-Immuntherapie sein könnte (Jakobisiak, 2011). 2010 wurde ein hepatotropes Adeno-assoziiertes Virus (AAV8) so moduliert, dass es einen IL-15-Superagonisten exprimieren kann. Dieser Superagonist besteht aus IL-15, das kovalent an den IL-15 $\alpha$  Rezeptor gebunden ist. Eine einzige Injektion von diesem AAV8 führte bei Mäusen mit metastastischem HCC zu einer Expansion mononukleärer Zellen, v.a. von NK-Zellen. Mäuse, die diese Injektion erhielten, überlebten signifikant länger gegenüber der Vergleichsgruppe. Offensichtliche Leberschädigungen durch die Injektion wurden nicht detektiert (Chang, 2010).

Trotz der im Vergleich zu IL-2 diskutierten geringeren zu erwartenden Nebenwirkungen (aufgrund geringerer notwendiger Dosierung) und der Ergebnisse von Chang, die über

fehlende Lebertoxizität von IL-15 berichten, sind unerwünschte Nebeneffekte einer IL-15 Therapie zu erwarten. IL-15 kann eine Zytokinkaskade triggern, die zur Aktivierung proinflammatorischer Chemokine und autoreaktiver T-Lymphozyten führen kann, was wiederum die Entstehung von Autoimmunprozessen zur Folge haben kann (McInnes, 2004; Waldmann, 2006; Oh, 2008). Im Gegenzug zur Anti-Tumorthherapie, bei der ein IL-15-Einsatz bislang nur diskutiert wurde, sind bei Autoimmunerkrankungen bereits monoklonale IL-15-Antikörper in klinischen Testverfahren zum Einsatz gekommen (Jakobisiak, 2011). Nichtsdestotrotz haben die vielversprechenden Charakteristika von IL-15 – die Stärkung einer antitumoralen Antwort des Immunsystems, kombiniert mit einer im Vergleich zu IL-2 geringeren Toxizität – dazu geführt, dass IL-15 an erster Stelle der potentiellen Angriffsziele einer immunomodulatorischen Anti-Tumorthherapie steht (Cheever, 2008). Es laufen bereits mehrere klinische Experimente zum Einsatz von IL-15 als Anti-Tumorthherapie beim malignen Melanom oder dem Nierenzellkarzinom. Die Ergebnisse dieser Studien stehen jedoch noch aus. Unter den aktuellen Studien findet sich allerdings noch keine zur Untersuchung eines Effekts von IL-15 im Rahmen von Lebererkrankungen (Steel, 2012).

#### **4.8 IL-15: Faktor der Leberregeneration oder der Lebergewebeschädigung?**

Nicht abschließend klären lässt sich, ob IL-15 nun als Faktor der Leberregeneration oder aber als Faktor der Leberschädigung zu sehen ist. Auf mRNA-Ebene zeigt sich eine Zunahme der Expression im Rahmen der Progression der Fibrosierung. Jedoch stellt sich die Frage ob IL-15 als Fibrose-fördernder oder Fibrose-hemmender Faktor agiert?

Bei Betrachtung der Ergebnisse des IL-15<sup>-/-</sup>-Mausmodells der Arbeitsgruppe von Prof. Hengstler – weniger fibrotische Septenbildung bei IL-15<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Leberschädigung – lässt sich vermuten, dass in IL-15 eher ein gewebeschädigender Faktor zu sehen ist. Eine Therapie der Leberzirrhose müsste demnach aus einem IL-15-neutralisierenden Antikörper bestehen. Die Entstehung der Leberzirrhose wird nicht unwesentlich durch chronische Inflammation gefördert und aufrechterhalten, in deren Rahmen Interleukine eine wichtige Rolle spielen. Suzuki et al. konnten besonders hohe IL-15 Serumwerte bei HCC-Patienten nachweisen (Suzuki, 2006) und auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der IL-15 mRNA Expression in HCC-umgebenden Zirrhosen. Dass IL-15 eine Rolle bei der Karzinogenese spielt, scheint äußerst wahrscheinlich. Doch ist IL-15 ein Faktor, der die Hepatokarzinogenese fördert?



Auf der anderen Seite ist bekannt, dass IL-15 einen wichtigen Faktor im Rahmen der Homöostase der NK-Zellen darstellt (s.Kap.1.5.5), welche wiederum bekannt sind für ihre Anti-Tumor-Aktivität (Colucci, 2003). Erhöhte IL-15 mRNA Expression im HCC-umgebenden Gewebe scheint mit einem nach Leberresektion zunächst verlängerten Überleben der betroffenen Patienten einherzugehen. Die aktuellen Mausmodelle zur Anti-Tumor-Therapie arbeiten scheinbar erfolgreich mit einem IL-15-Agonisten, der Mäusen mit HCC-Metastasen ein verlängertes Überleben ermöglicht (Chang, 2010). Ist IL-15 also doch ein Faktor, der das Tumorstadium verhindert?

In Zusammenschau all dieser Ergebnisse und Untersuchungen lässt sich folgende Hypothese ableiten: IL-15 mag grundsätzlich einen die Leberregeneration fördernden Faktor darstellen, u.a. durch genannte Aktivierung der antitumorös wirkenden NK-Zellen. Bei chronischer Leberschädigung steigt die Expression von IL-15 mRNA und die Synthese von IL-15 Protein an, um eine Proliferation der benötigten NK-Zellen zu bewirken. Entweder ist jedoch die entstehende Menge an NK-Zellen zu gering oder aber ihre antiapoptotische Resistenz vermindert, sodass letztlich die vorhandene Menge an IL-15 Protein nicht ausreicht, um die Entstehung einer Leberzirrhose oder eines HCC durch adäquate NK-Zellaktivität zu verhindern. Die neu entwickelten IL-15-Agonisten mögen zum Ausgleich dieses Defizits führen und daher den Ansatz einer potentiell erfolgreichen Anti-Tumor-Therapie darstellen. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, wäre IL-15 damit als Faktor der Leberregeneration anzusehen.

## 5 Zusammenfassung

Snail, ein EMT-Marker, wird in der Literatur als ein in Zusammenhang mit Organfibrosierung (Lunge, Prostata, Niere etc.) stehender Marker diskutiert, der auch eine Rolle im Rahmen der Entstehung von Leberfibrose und -zirrhose zu spielen scheint. Das Zytokin IL-15 ist bekannt als ein in Verbindung mit Gewebeinflammation stehender Faktor, der im Rahmen verschiedener Erkrankungen exprimiert wird. Zu IL-15 ist bisher wenig bezüglich seiner Rolle bei Lebererkrankungen beschrieben. Vorarbeiten haben gezeigt, dass IL-15<sup>-/-</sup>-Mäuse im Modell der chronischen Lebergewebeschädigung mittels Applikation von Tetrachlorkohlenstoff deutlich weniger Fibrosierung aufwiesen als der entsprechende Wildtyp. Mäuse mit fibrotisch verändertem Lebergewebe wiesen zudem deutlich erhöhte Expression an IL-15 mRNA auf. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Analyse der Expression von IL-15 mRNA und Snail mRNA in fibrotisch und zirrhotisch veränderten humanen Lebergeweben, sowie die Untersuchung möglicher Zusammenhänge mit klinischen, laborchemischen und histopathologischen Daten, um die Rolle von Snail und IL-15 bei der Entstehung der Leberfibrose und -zirrhose sowie einen potentiellen Einsatz dieser beider Faktoren als Biomarker für Diagnostik und/oder Therapie zu evaluieren. Dazu wurde die Expression der IL-15 mRNA und Snail mRNA in 173 humanen Lebergewebeproben analysiert, die unterschiedliche Stadien der Fibrogenese aufwiesen (Normalgewebe/ Fibrose/ Zirrhose/ HCC-umgebende Zirrhose). Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Proteinsynthese von IL-15 mittels immunhistochemischer Färbung in Lebergewebeschnitten zur Detektion IL-15-produzierender Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die IL-15 mRNA Expression positiv mit zunehmender Fibroseprogression des humanen Lebergewebes korreliert. Darüber hinaus zeigten HCC-umgebende Leberzirrhosen einen tendenziellen Anstieg der Expression von IL-15 mRNA gegenüber zirrhotisch veränderten Lebergeweben. Dieser Zusammenhang ließ sich für die Expression von Snail mRNA nicht nachweisen. Sowohl die Expression von Snail mRNA als auch von IL-15 mRNA zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie der Leberzirrhose. Patienten mit HCC-umgebenden Leberzirrhosen und hohem Level an IL-15 mRNA wiesen in den ersten postoperativen Jahren tendenziell eine höhere Überlebensrate gegenüber Patienten mit niedriger IL-15 mRNA Expression im Lebergewebe auf, wogegen die Snail mRNA Expression nicht mit dem Patientenüberleben korrelierte. In immunhistochemischen Färbungen konnte IL-15 vor allem in Hepatozyten, aber auch in Gallengangepithelzellen und Periportalfeldern nachgewiesen werden, nicht aber in nicht-parenchymalen Zellen.

In Snail wurde als einem wichtigen Vertreter von EMT lange Zeit eine tragende Rolle im Rahmen der Fibrogenese der Leber vermutet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten jedoch die Hypothese, dass die Expression von Snail mRNA mit zunehmender Leberfibrosierung ansteigt, nicht belegen. In der aktuellen Literatur wird das Vorhandensein von Snail im Rahmen der Organfibrosierung sehr kontrovers diskutiert. Um die genaue Funktion von Snail zu determinieren, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Im Gegensatz dazu rückt die Rolle von IL-15 im Rahmen der Leberfibrosierung und Entstehung des HCC zunehmend in den Fokus. Das therapeutische Potential von IL-15 als Anti-Tumor-Therapie wird bereits in klinischen Studien untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass IL-15 nicht nur im Rahmen der Fibrogenese, sondern auch im Rahmen der Hepatokarzinogenese von Bedeutung ist. Die tendenziell erhöhte Überlebensrate in den ersten postoperativen Jahren nach Leberresektion bei hoher IL-15 mRNA Expression im peritumoralen Lebergewebe machen IL-15 als potentiellen Biomarker interessant. Die Ergebnisse weiterer Studien, die den Einsatz von IL-15 als diagnostischen Marker oder als therapeutisches Target evaluieren, stehen derzeit jedoch noch aus.

## 6 Literaturverzeichnis

Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ, Beller DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J Immunol* 1997; 159(6):2941-2951.

Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, Reaman GH, Tosato G. Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233(1):231-7.

Arasteh K, Baenkler HW, Bieber C, et al.: Duale Reihe, Innere Medizin. Leber. (ISBN 9783131181626) © 2009 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.

Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintial R, Dummer W, Surh CD, Havran WL, Theofilopoulos AN. Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. *J Immunol* 2005; 174:4606-4612.

Bahr MJ, Manns MP. Liver cirrhosis. *Internist* 1999; 40(12):1308-22.

Battaller R, Brenner DA. Liver Fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209-218.

Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344(7):495-500.

Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J; EASL Panel of Experts on HCC. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the study of the liver. *J Hepatol* 2001; 35(3):421-30.

Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(4):259-80.

Bundesärztekammer. Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG. März 2013.

Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004; 200(7):825-34.

But DYK, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(11):1652-6.

BZgA. Kurzintervention bei Patienten mit Alkoholproblemen: Ein Leitfaden für die ärztliche Praxis. 2001

Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; 180(4):1395-403.

Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2578-82.

Chang CM, Lo CH, Shih YM, Chen Y, Wu PY, Tsuneyama K, Roffler SR, Tao MH. Treatment of hepatocellular carcinoma with adeno-associated virus encoding interleukin-15 superagonist. *Hum Gene Ther* 2010; 21(5):611-21.

Cheever, MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev* 2008; 222:357-68.

Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009; 50(6):2007-13.

Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, Senzolo M, Rolles K, Patch D, Burroughs AK. A Systematic Review of the Performance of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) in the Setting of Liver Transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(7):1049-61.

Christensen E. Prognostic models including the Child-Pugh, MELD and Mayo risk scores—Where are we and where should we go? *J Hepatol* 2004; 41(2):344-50.

Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, Stanger BZ, Wells RG. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2011; 53(5):1685-95.

Ciuclan L, Ehnert S, Ilkavets I, Weng HL, Gaitantzi H, Tsukamoto H, Ueberham E, Meindl-Beinker NM, Singer MV, Breitkopf K, Dooley S. TGF-beta enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. *J Hepatol* 2010; 52(3):407-16.

Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5):413-25.

Conn H, Atterbury C. Cirrhosis. In: Schiff L, Schiff E, eds. Diseases of the liver, 7th edn, Philadelphia, PA: Lippincott, 1993: 875–934.

Cookson S, Doherty DG, Todryk S, Gibbs P, Portmann B, O'Grady J, Rela M, Heaton N, Norris S. Hepatic expression of IL-15 mRNA is associated with liver graft acceptance. *Transplant Immunol* 2003; 11(1):39-48.

Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127(11):981-5.

Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000; 46(12):2027-49.

Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl(1):S100-7.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(7):2557-76.

Endres S, Anz D, Bourquin C. Biomarker: Anwendung in der Praxis – Beispiel Gastroenterologie. In: Biomarker. Schmitz, G, Endres S, Götte D. Schattauer Verlag, Stuttgart 2008.

Everson GT. Management of cirrhosis due to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl(1):S65-74.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:571-611.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1):S99-S112.

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology* 2004; 127(5 Suppl 1):S35-50

Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97(1):14-32.

Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, Freud AG, Robinson ML, Durbin J, Caligiuri MA. Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice follows early expansion in NK and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2001; 193(2):219-31.

Fehniger TA, Yu H, Cooper MA, Suzuki K, Shah MH, Caligiuri MA. IL-15 costimulates the generalized Shwartzman reaction and innate immune IFN- $\gamma$  production in vivo. *J Immunol* 2000; 164(4):1643-7.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12):2893-917.

Fracanzani AL, Fargion S, Romano R, Conte D, Piperno A, D'Alba R, Mandelli C, Fraquelli M, Pacchetti S, Braga M, et al. Portal hypertension and iron depletion in patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1995; 22(4 Pt 1):1127-31.

Franco DL, Mainez J, Vega S, Sancho P, Murillo MM, de Frutos CA, Del Castillo G, López-Blau C, Fabregat I, Nieto MA. Snail1 suppresses TGF- $\beta$ -induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 20):3467-77.

Friedman S, Schiano T. Cirrhosis and its sequelae. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Textbook of Medicine. 22nd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2004:936-44.

Friedman SL. Hepatic fibrosis – Overview. *Toxicology* 2008; 254(3):120-9.

Friedman SL. Hepatic stellate cells - protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88(1):125-72.

Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(8):425-36.

Gaggero A, Azzarone B, Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, Rubartelli A, Ferrini S. Differential intracellular trafficking, secretion, and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur J Immunol* 1999; 29(4):1265-74.

Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):311-35.

Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* 1994; 13(12):2822-30.

Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995; 14(15):3654-63.

Golden-Mason L, Kelly AM, Doherty DG, Traynor, O, McEntee G, Kelly J, Hegarty JE, O'Farrelly C. Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(1):94-101.

Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 264(5161):965-8.

Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J. Hepatology* 1995; 22(2 Suppl):28-36.

Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension. From bedside to bench. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(4 Suppl 2):S125-30.



Guo Y, Zhang Y, Klein R, Nijm GM, Sahakian AV, Omary RA, Yang GY, Larson AC. Irreversible electroporation therapy in the liver: longitudinal efficacy studies in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70(4):1555-63.

Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:425-56.

Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* 2009; 137(4):1459-66.e1.

Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shirota Y, Kobayashi K. Differential Gene Expression Between Chronic Hepatitis B and C Hepatic Lesion. *Gastroenterology* 2001; 120(4):955-66.

Huber M, Schwarz W, Zeuzem S. Klinik der Leberzirrhose und ihrer Komplikationen sowie diagnostische Fragestellungen. *Radiologe*, 2001; 41:840-851.

Ikegami T, Zhang Y, Matsuzaki Y. Liver fibrosis: Possible involvement of EMT. *Cells Tissues Organs* 2007; 185(1-3):213-21.

Ito K, Mitchell DG, Hann HW, Kim Y, Fujita T, Okazaki H, Honjo K, Matsunaga N. Viral-induced cirrhosis: Grading of severity using MR imaging. *Am J Roentgenol* 1999; 173(3):591-6.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3):341-50.

Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22(2):99-108.

Jung GE, Encke J, Schmidt J, Rahmel A. Model for end-stage liver disease - Neue Grundlage der Allokation für die Lebertransplantation. *Chirurg* 2008; 79:157–163

Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013; 38(2):209-23.

Kakumu S, Okumara A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K, Yoshikai Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 109(3):458-63.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1776-84.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1420-8.

Kennedy MK, Park LS. Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *J Clin Immunol* 1996; 16(3):134-43.

Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in IL-15 deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191(5):771-80.

Kirman I, Vainer B, Nielsen OH. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Res* 1998; 47(7):285-9.

Kisseleva T, Brenner DA. Is it the end of the line for the EMT? *Hepatology* 2011; 53(5):1433-5.

Kunutsor SK, Apekey TA, Walley J. Liver aminotransferases and risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2013; 178(2):159-71.

Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* 2003; 112(4):503-16.

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362(9399):1907-17.

Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; 9(5):669-76.

Lok AS, McMahon BJ, Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39(3):857-61.

Lorenzen I, Dingley AJ, Jacques Y, Grötzinger J. The structure of the interleukin-15 alpha receptor and its implications for ligand binding. *J Biol Chem* 2006; 281(10):6642-7.

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37(4):917-23.

Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, Poynard T. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006; 44(1 Suppl):S19-24.

McInnes IB, Gracie JA. Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(4):392-7.

Meindl-Beinker NM, Dooley S. Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23 Suppl 1:S122-7.

Min AL, Choi JY, Woo HY, Kim JD, Kwon JH, Bae SH, Yoon SK, Shin SH, Chung YJ, Jung CK. High expression of Snail mRNA in blood from hepatocellular carcinoma patients with extra-hepatic metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26(7):759-67.

Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Permuter RM, Taniguchi T. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 1995; 81(2):223-31.

Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92(2):252-8.

Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56<sup>+</sup> natural killer cells from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87(7):2632-40.

Niemelä O, Alatalo P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70(5):305-12.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3):155-66.

Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, Matsuguchi T, Suzuki M, Ohashi PS, Yoshikai Y. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J Exp Med* 2000; 191(1):157-70.

Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(11):2089-93.

Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(13):5201-6.

Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12):4765-70.

Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108(9):1369-78.

Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008; 118:3331–3342.

Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A. Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1987; 92(1):208-14.

Ottomanelli, G. Methadone Patients and Alcohol Abuse. *J Subst Abuse Treat* 1999; 16(2):113-21.

Pruett SB, Fan R, Zheng Q. Acute ethanol administration profoundly alters poly I:C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. *Life Sci* 2003; 72(16):1825-39.

Quinn LS, Haugk KL, Grabstein KH. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 1995; 136(8):3669-72.

Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 1996; 111(6):1706-13.

Ross ME, Caligiuri MA. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 1997; 89(3):910-8.

Rowell DL, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang SK, Kagnoff MF. Human hepatocyte express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1):G322-32.

Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130(6):1807-21.

Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 2008; 88(2):112-23.

Sarrazin U, Brodt HR, Sarrazin C, Zeuzem S. Prophylaxe gegenüber HBV, HCV und HIV nach beruflicher Exposition. *Deutsches Ärzteblatt* 2005; 102(33): A 2234–2239.

Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Macchi V, Stefani A, Signori S, Buda A, Fabris P, Giordani MT, De Caro R, Palù G, Castagliuolo I, Martines D. Snail1 transcription factor is a critical mediator of hepatic stellate cell activation following hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300(2):G316-26.

Schmidt LG. Frühdiagnostik und Kurzintervention beim beginnenden Alkoholismus. *Deutsches Ärzteblatt* 1997; 94(44):A2905-A2908.

Schmidt R, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen. Springer Verlag, 2010. Kap.38: Funktionen des Magen-Darm-Trakts. Leber und Gallensekretion; S.862-868.

Scholten D, Österreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2010; 139(3):987-98.

Schouten JN, Francque S, Van Vlierberghe H, Colle I, Nevens F, Delwaide J, Adler M, Starkel P, Ysebaert D, Gadisseur A, De Winter B, Smits JM, Rahmel A, Michielsen P. The influence of laboratory-induced MELD score differences on liver allocation: more reality than myth. *Clin Transplant* 2012; 26(1):E62-70.

Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):351-72.

Schuppan D, Afdhal NH. Liver Cirrhosis. *Lancet* 2008; 371(9615):838-51.

Seaman WE, Gindhart TD, Greenspan JS, Blackman MA, Talal N. Natural killer cells, bone, and the bone marrow: studies in estrogen-treated mice and in congenitally osteopetrotic (mi/mi) mice. *J Immunol* 1979; 122(6):2541-7.

Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S35-46.

Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33(1):35-41.

Straub BK, Schirmacher P. Pathology and biopsy assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; 28(1):197-202.

Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7):2657-64.

Suzuki A, McCall S, Choi SS, Sicklick JK, Huang J, Qi Y, Zdanowicz M, Camp T, Li, YX, Mae Diehl A. Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity. *J Hepatology* 2006; 45(3):410-8.

Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, Bamford RN, Waldmann TA. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(26):14444-9.

Taura K, Miura K, Iwaisako K, Österreicher CH, Kodama Y, Penz-Österreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2010; 51(3):1027-36.

Tchelepi H, Ralls PW, Radin R, Grant E. Sonography of diffuse liver disease. *J Ultrasound Med* 2002; 21(9):1023-32.

Techasen A, Namwat N, Loilome W, Bungkanjana P, Khuntikeo N, Puapairoj A, Jearanaikoon P, Saya H, Yongvanit P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) stimulates the epithelial-mesenchymal transition regulator Snail in cholangiocarcinoma. *Med Oncol* 2012; 29(5):3083-91.

Trotter JF, Brimhall B, Arjal R, Phillips C. Specific laboratory methodologies achieve higher model for endstage liver disease (MELD) scores for patients listed for liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10(8):995-1000.

Van Es T, van Puijvelde GH, Michon IN, van Wanrooij EJ, de Vos P, Peterse N, van Berkel TJ, Kuiper J. IL-15 aggravates atherosclerotic lesion development in LDL receptor deficient mice. *Vaccine* 2011; 29(5):976-83.

Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(8):595-601.

Woo HY, Min AL, Choi JY, Bae SH, Yoon SK, Jung CK. Clinicopathologic significance of the expression of Snail in hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2011; 17(1):12-8.

Wu Y, Zhou, BP. Snail – More than EMT. *Cell Adh Migr* 2010; 4(2):199-203.

Yao Z, Mishra L. Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(18):1691-8.

Yee HF, Lidofsky SD. Acute liver failure. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, eds. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2002:1567–74

Yoshikai Y, Nishimura H. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2000; 2(4):381-9.

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282(32):23337-47.

Zeisberg M, Duffield JS. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(8):1247-53.

Zhang H, Meadows GG. Chronic alcohol consumption in mice increases the proportion of peripheral memory T cells by homeostatic proliferation. *J Leukoc Biol* 2005; 78(5):1070-80.

Zhang H, Meadows GG. Exogenous IL-15 in combination with IL-15R alpha rescues natural killer cells from apoptosis induced by chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(3):419-27.

Zhou H, Huang H, Shi J, Zhao Y, Dong Q, Jia H, Liu Y, Ye Q, Sun H, Zhu X, Fu L, Guo K, Gao D, Sun J, Yan Z, Ren N, Tang Z, Qin L. Prognostic value of interleukin 2 and interleukin 15 in peritumoral hepatic tissues for patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma after curative resection. *Gut* 2010; 59(12):1699-708.

Zollner G, Fickert P, Trauner M. Cholestase. *Wiener klinische Wochenschrift Education* 2007; 2(3):125-140.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AFP	Alpha-Fetoprotein
AI	Autoimmunhepatitis
AP	Alkalische Phosphatase
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone morphogenetic protein
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHE	Cholinesterase
CT	Computertomographie
CTP	Child-Turcotte-Pugh-Score
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ETS	Erythroblast transformation specific transcription factor
EZM	Extrazellulärmatrix
FAP	Fibroblast activation protein
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FOXC2	Forkhead box protein C2
FSP	Fibroblast specific protein
FTS	Filamenting temperature-sensitive protein
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
G(M)-CSF	granulocyte (macrophage) colony-stimulating factor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
Hh	Hedgehog
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSC	Hepatische Sternzelle
HTCR	Human Tissue Cell Research

IFN- $\alpha/\gamma$	Interferon-alpha/ -gamma
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
Jak	Januskinase
KC	Kupffer-Zelle
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LPS	Lipopolysaccharid
LSP	Long signal peptide
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
MET	Mesenchymal to Epithelial Transition
MF	Myofibroblast
MIP	Macrophage inflammatory protein
miR	mikro Ribonukleinsäure
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
M $\phi$	Makrophage
MUC1	Mucin 1
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NK- Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT- Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
OB	Osteoblast
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RIN	RNA Integrity Number
SMA- $\alpha$	Smooth muscle actin-alpha
SNAG	Snail/ Gfi-Domäne
SSC	Sekundär sklerosierende Cholangitis
SIP1	Survival motor neuron interacting protein 1
SSP	Short signal peptide
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor-beta
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha

ZEB1/2

Zinc finger E-boxbinding homeobox 1/2

ZO

Zonula Occludens

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Normale Leber.....	7
Abbildung 2: Hepatische Fibrosierung. ....	8
Abbildung 3: Ursprung von Myofibroblasten im Rahmen der Leberfibrose.....	9
Abbildung 4: Schema des EMT-Prozesses.....	10
Abbildung 5: Struktur und Signalweg von IL-15 und IL-2. ....	16
Abbildung 6: Wechselwirkung zwischen Makrophagen, IL-15 und NK- Zellen. ....	18
Abbildung 7: Modell der chronischen Leberschädigung an murinen Lebergeweben durch CCl <sub>4</sub> , welches zur Fibrosierung führt.....	20
Abbildung 8: Die Lebergewebe von Wildtyp-Mäusen und IL-15 <sup>-/-</sup> -Mäusen im chronischen CCl <sub>4</sub> -Modell.....	21
Abbildung 9: Legende zur Darstellung der Boxplot-Diagramme .....	32
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der IL-15 mRNA Expression im untersuchten Probenkollektiv.....	34
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der Snail mRNA Expression im untersuchten Probenkollektiv.....	34
Abbildung 12: IL-15 mRNA Expression im humanen Lebergewebe.....	35
Abbildung 13: Snail mRNA Expression im humanen Lebergewebe.....	36
Abbildung 14: Expression von IL-15 mRNA in Leberzirrhosen unterschiedlicher Ätiologie. ...	38
Abbildung 15: Expression von Snail mRNA in Leberzirrhosen unterschiedlicher Ätiologie. ...	38
Abbildung 16: Korrelation der Hepatitis-Serologie mit der IL-15 mRNA Expression.....	39
Abbildung 17: Korrelation des Geschlechts der Patienten mit Leberzirrhose mit der IL-15 mRNA bzw. Snail mRNA Expression.....	45
Abbildung 18: Korrelation des Alkoholkonsums der untersuchten Patienten mit der IL-15 mRNA Expression.....	47
Abbildung 19: Korrelation des Alkoholkonsums der untersuchten Patienten mit der Snail mRNA Expression.....	47
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben in Monaten nach Leberresektion bei Patienten mit Leberzirrhose in Abhängigkeit von der IL-15 mRNA Expression. ....	53
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben in Monaten nach Leberresektion bei Patienten mit Leberzirrhose in Abhängigkeit von der Snail mRNA Expression. ....	54

Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben in Monaten nach kurativer Leberresektion eines HCC-Herdes bei Patienten mit HCC-umgebender Leberzirrhose in Abhängigkeit von der IL-15 mRNA Expression. ....	55
Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis der IL-15 Expression im HCC-umgebenden zirrhotischen Gewebe und Negativkontrolle mit isotypischem IgG-Antikörper. ....	57
Abbildung 24: Anti-IL-15-Färbung eines zirrhotischen Lebergewebes bedingt durch Hepatitis B. ....	58
Abbildung 25: Einteilung der verschiedenen Färbeintensitäten der anti-IL-15-immunhistochemischen Färbung. ....	59
Abbildung 26: Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung mit der Gewebediagnose. ....	60
Abbildung 27: Korrelation der Anzahl der IL-15-positiven Zellen mit der Gewebediagnose. ....	60
Abbildung 28: Korrelation des immunhistochemischen Scores für IL-15 mit der Gewebediagnose. ....	61

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen der Leberzirrhose (neben alkoholtoxischer und viraler Zirrhose).....	2
Tabelle 3: Klassifikation der Leberzirrhose nach Child-Turcotte-Pugh .....	5
Tabelle 4: 1-Jahres-Überlebensrate nach Child-Turcotte-Pugh-Score .....	6
Tabelle 5: 3-Monats-Mortalität nach MELD-Score .....	6
Tabelle 6: Geräte und Materialien .....	24
Tabelle 7: Reagenzien .....	24
Tabelle 8: Anpassung des Volumens an RLT-Puffer an die prozessierte Gewebemenge ....	26
Tabelle 9: Anpassung der Zugabe von Ethanol (70%) an die prozessierte Gewebemenge ..	27
Tabelle 10: Einteilung der Färbeintensität.....	31
Tabelle 11: Einteilung der Gewebeproben nach histopathologischem Befund .....	33
Tabelle 12: Ätiologie der zirrhotischen Lebergewebe .....	37
Tabelle 13: Korrelation des CTP- und MELD-Score mit der IL-15 mRNA Expression.....	41
Tabelle 14: Korrelation des CTP- und MELD-Score mit der Snail mRNA Expression.....	41
Tabelle 15: Korrelation der klinischen Merkmale mit der IL-15 mRNA Expression.....	43
Tabelle 16: Korrelation der klinischen Merkmale mit der Snail mRNA Expression .....	44
Tabelle 17: Korrelation des Nikotinkonsums der Patienten mit der IL-15 mRNA Expression .....	46
Tabelle 18: Korrelation des Nikotinkonsums der Patienten mit der Snail mRNA Expression .....	46
Tabelle 19: Korrelation laborchemischer Parameter mit der IL-15 mRNA Expression .....	49
Tabelle 20: Korrelation laborchemischer Parameter mit der Snail mRNA Expression.....	50
Tabelle 21: Korrelation der histopathologischen Veränderungen mit der IL-15 mRNA Expression .....	51
Tabelle 22: Korrelation der histopathologischen Veränderungen mit der Snail mRNA Expression .....	52
Tabelle 23: Auswertung der IL-15 mRNA Expression in der Leberzirrhose und Korrelation mit der Überlebenszeit nach Leberresektion im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren .....	53
Tabelle 24: Auswertung der Snail mRNA Expression in der Leberzirrhose und Korrelation mit der Überlebenszeit nach Leberresektion im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren.....	54

Tabelle 25: Auswertung der IL-15 mRNA Expression in peritumoralem zirrhotischen Lebergewebe von Patienten mit HCC und Korrelation mit der Überlebenszeit nach kurativer Leberresektion im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren .....	55
Tabelle 26: Charakterisierung der Gewebeschnitte für die immunhistochemische Färbung .....	56

## 10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich vielmals bei Prof. Dr. Thomas Weiß für die interessante Fragestellung, die Übernahme des Erstgutachtens und vor allem für seine Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Thomas war mir ein hervorragender Betreuer, auf den man sich immer verlassen konnte. Er war jederzeit präsent und hat in ausgewogenem Maße gefördert und gefordert. Ohne ihn, seine Ideen und unsere Diskussionen wären ich und das Projekt nicht so weit gekommen. Mit seiner Hilfe war es mir möglich, das vorliegende Thema auf sowohl nationaler als auch internationaler Ebene präsentieren und diskutieren zu können. Nicht zuletzt danke ich ihm auch für viele Stunden unterhaltsamer und lehrreicher Gespräche abseits von Forschungsthemen.

Bei Rania Dayoub, Madeleine Lupke, Stefan Kirchner, Elke Gerstl und Susanne Heyn möchte ich mich für die Hilfe im Laboralltag bedanken und zudem für die netten Plaudereien zwischendurch.

Für die Durchführung der qRT-PCR sowie die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Hengstler an der Technischen Universität Dortmund.

Darüber hinaus möchte ich meinen Freunden und vor allem meiner Familie Danke sagen für die seelische Unterstützung während des Studiums und während der Promotion.

Danke auch an Bernhard, der im vergangenen Jahr immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Geschichten hatte und mir eine große Stütze ist.

Für ihre Liebe und Unterstützung danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mich jederzeit unterstützt haben.



## 11 Posterpräsentationen

### **German Association of the Science of the Liver 2011, Regensburg:**

Vogt R, Godoy P, Campos G, R Stöber, Hengstler JG, Schlitt HJ, Melter M, Weiss TS. IL-15 mRNA expression is associated with liver cirrhosis. *Z Gastroenterol* 2011; 49 - P1\_55

Schlagheck J, Godoy P, Campos G, Stöber R, Hengstler JG, Vogt R, Melter M, Weiss TS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) associated transcription factor Goosecoid is highly expressed in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Z Gastroenterol* 2011; 49 - P2\_77

### **Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft 2011, Regensburg:**

Vogt R, Godoy P, Campos G, Stöber R, Hengstler JG, Schlagheck J, Melter M, Weiss TS. Erhöhte Interleukin-15 mRNA Expression in zirrhotischem Lebergewebe – ein potentieller Faktor der Hepatokarzinogenese? *Tagungsprogramm der DTG* 2011, p.120, Poster 198.

### **European Association of the Science of the Liver 2011, Berlin:**

Vogt R, Godoy P, Campos G, Stöber R, Hengstler JG, Schlitt HJ, Melter M, Weiss TS. Patients with liver cirrhosis demonstrate high IL- 15 mRNA expression. *J Hepatology* 2011; 54, p.S421. Poster 1062

### **American Association of the Science of Liver Diseases 2011, San Francisco:**

Vogt R, Godoy P, Campos G, Stoeber R, Hengstler JG, Melter M, Weiss TS. IL-15 mRNA is enhanced in cirrhotic liver – potential role for hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2011; 54, p.747A, Poster 817.

## **12 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 06.11.2013

Regine Vogt